Synthese von Lactoflavin (Vitamin B_2) und anderen Flavinen

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE

DER NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT
DER JOHANN WOLFGANG GOETHE-UNIVERSITÄT
ZU FRANKFURT AM MAIN

vorgelegt von

Friedrich Weygand
aus Eichelsdorf

1936

Dissertationsdruckerei von F. W. Kalbfleisch in Gelnhausen.

Referent : Professor Dr. W. Borsche.

Tag der mündlichen Prüfung : 17. Februar 1936.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Meinen lieben Eltern.

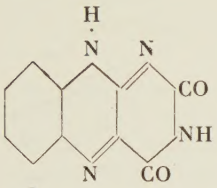
Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552326_0024

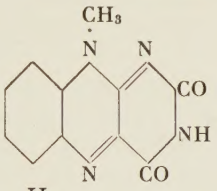
Das Lumilactoflavin, die Farbstoffkomponente des gelben Vitamins B_2, ist von R. Kuhn und H. Rudy[1]) auf Grund eingehender Abbauversuche als 6, 7, 9-Trimethyl-iso-alloxazin (= 6, 7, 9-Trimethyl-flavin) erkannt worden. Nachdem das iso-Alloxazin (I) bisher weder als solches, noch in Form von Derivaten bekannt ist, habe ich versucht, die farbige Stammsubstanz des Vitamins B_2 und dieses selbst auf einem klaren, durchsichtigen Wege darzustellen.

Die Synthese des Stammkörpers gelang durch Kondensation von Alloxan mit N-Methyl-o-phenylendiamin in salzsaurer Lösung, die in guter Ausbeute zum 9-Methyl-iso-alloxazin (II) führt.

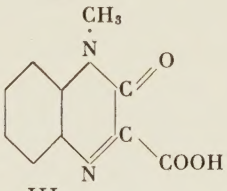
Der synthetische Farbstoff krystallisiert aus verd. Essigsäure in prachtvollen, derben, orangefarbigen Prismen.



I



II

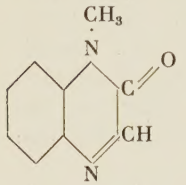


III

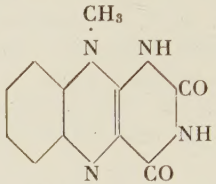
Beim Erhitzen färbt er sich über 300° zunehmend dunkler und zersetzt sich unter Schäumen bei etwa 392°. Dem Lumilactoflavin ist der Farbstoff in folgenden Eigenschaften zum Verwechseln ähnlich: Die gelben Lösungen zeigen äußerst intensive grüne Fluorescenz, die jedoch eine Spur blaustichtiger ist als die des Lumilactoflavins. Auf Zusatz von Alkalien verschwindet die Fluorescenz, während die gelbe Farbe bestehen bleibt. Durch Mineralsäuren findet neben dem Verlust der Fluorescenz auch Farbaufhellung statt. Beide Erscheinungen sind reversibel. Gegen Mineralsäuren und Oxydationsmittel (Brom) ist der Farbstoff auch in der Hitze sehr beständig. Beim Kochen mit 2-n Natronlauge ist er nach etwa 1 Min. unter Entfärbung zerstört. Die dabei neben Harnstoff isolierte Oxo-carbonsäure (III) ist ebenso wie deren Decarboxylierungsprodukt (IV) bereits bekannt durch die

[1]) B. *67*, 1298 (1934) und H. Rudy in C. Oppenheimer: Handbuch der Biochemie. III. Ergänzungsband (1935).

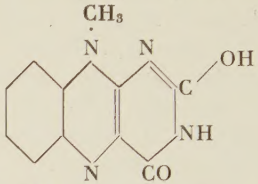
Untersuchung von O. Kühling und O. Kaselitz[2]). Die Verbindung III erinnert in allen Eigenschaften an die Oxocarbonsäure $C_{12}H_{12}N_2O_3$ vom Schmp. 215°, die R. Kuhn und H. Rudy[1]) aus Lumilactoflavin dargestellt haben. Sie ist wie diese blaß gelb, löst sich in verd. Alkalien farblos, in konz. Salzsäure orangerot.



IV



V



VI

Die aus der β-Oxo-carbonsäure auf thermischem Wege leicht erhältliche Verbindung IV entspricht ganz dem Sublimat $C_{11}H_{12}N_2O$ vom Schmp. 175°, das aus Lactoflavin erhalten wurde.

Das 9-Methyl-iso-alloxazin ist leicht verküpbar. Es wird wie Lactoflavin durch Natriumhydrosulfit spielend zur Leuko-Verbindung (V oder VI) reduziert, aus der sich unter dem Einfluß des Luftsauerstoffs der gelbe, grün fluorescierende Farbstoff zurückbildet.

Von bekannten Küpenfarbstoffen erscheint, auch dem Reduktions-Oxydationspotential[3]) nach, vergleichbar das Rosindulin GG[4]), in dem an Stelle von Methyl eine Phenylgruppe am Stickstoff sitzt und der Pyrimidinkern durch einen Naphtalinkern ersetzt ist. Beim Rosindulin ist die Leukoverbindung nur entsprechend VI formulierbar. Bei Reduktion in Mineralsäuren liefert der synthetische Farbstoff ein rotes Radikal als Zwischenstufe, genau wie Lactoflavin, an dem diese Reaktion von R. Kuhn und Th. Wagner-Jauregg[5]) aufgefunden wurde.

Das licht-elektrisch gemessene Absorptionsspektrum des 9-Methyl-iso-alloxazins (Abbild. 1) zeigt große Aehnlichkeit mit dem von Lumiflavinpräparaten verschiedener Herkunft, besitzt aber schärfere Struktur. Das langwellige Hauptmaximum (440 mμ gegenüber 445mμ) ist etwas niedriger, die größten Unterschiede finden sich zwischen 300—360 mμ. In diesem Gebiet differieren auch Lumi-flavin-Präparate verschiedener Herkunft und Darstellung am stärksten.

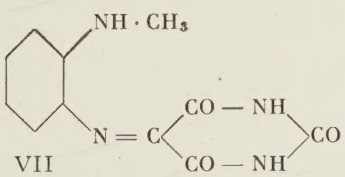
---

[2]) B. *39*, 1314 (1906).
[3]) L. Michaelis, Oxydation-Reduktions-Pot entiale, 2. Aufl. J. Springer, Berlin, 1933, S. 106 f.
[4]) Schultz, Farbstoff-Tabellen Nr. 674.
[5]) B. *67*, 361 (1934).

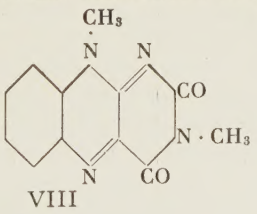
Für die Synthese von 9-Alkyl-iso-alloxazinen kommt neben dem hier beschriebenen Wege auch eine unter molekularer Umlagerung verlaufende Alkylierung von Alloxazinen in Frage. Methylierung des Alloxazins durch Jodmethyl und durch Diazomethan wurden von R. Kuhn und F. Bär[6]) eingehend beschrieben. Ebenfalls mit der Alkylierung von Alloxazinen haben sich auch K. G. Stern und E. R. Holiday befaßt[7]). Diese erhielten aus Alloxazin mit schmelzendem Kaliummethylsulfat Verbindungen in ziemlich unreinem Zustande, die die wesentlichen Eigenschaften der Flavine aufweisen. Es dürfte aber ausgeschlossen sein, unter so gewaltsamen Bedingungen Reaktionen zu verwirklichen, die bei den in Rede stehenden Körpern für Fragen der Konstitution irgendwie beweisend sein könnten.

Die klare, durchsichtige Synthese des Stammkörpers der Flavine aus N-Methyl-o-phenylendiamin und Alloxan, wie sie von mir gefunden wurde, läßt keinen Zweifel, daß auch in allen flavin-ähnlichen Produkten, die aus Alloxazinen zu entstehen scheinen, Derivate des iso-Alloxazins vorliegen. Daraus folgt, daß die Vorstellung von K. G. Stern und E. R. Holiday, die am 9- bzw. 10-ständigen Stickstoffatom alkylierte Alloxazine erhalten haben wollen, zweifellos unrichtig ist: Die fraglichen Produkte können nur unter molekularer Umlagerung entstanden sein und sich vom iso-Alloxazin ableiten. Inwieweit durch schmelzende Alkali-alkyl-sulfate auch die so leicht methylierbaren Stickstoffatome des Pyrimidinringes angegriffen werden, ist nicht zu sagen.

Nach O. Kühling und O. Kaselitz[2]) erhält man durch Kondensation von N-Methyl-o-phenylendiamin mit Alloxan in alkoholischer Lösung bei 15—20° unter Austritt von 1 Mol Wasser das Alloxanyl-methyl-o-phenylendiamin (VII), das gegen Mineralsäuren sehr beständig ist und auch bei längerem Kochen mit 25-proz. Salzsäure ganz unverändert bleibt. Aus den angeführten Beobachtungen folgt, daß das Anil (VII) nicht Zwischenprodukt der Flavinsynthese sein kann. Es war somit verlockend zu prüfen,



VII



VIII

[6]) B. *67*, 898 (1934).
[7]) B. *67*, 1104 (1934).

wovon es abhängt, ob bei der Kondensation von Methyl-o-phenylendiamin mit Alloxan das Anil oder das Flavin entsteht.

Aus diesbezüglichen Versuchen geht hervor, daß die Flavinbildung glatt verläuft, wenn der Base Gelegenheit zur Salzbildung gegeben wird. Die zuerst verwendete Salzsäure konnte ersetzt werden durch Schwefelsäure, Phosphorsäure, Salpetersäure, Oxalsäure, Essigsäure und andere. Auch wasserfreie Lösungsmittel sind für die Synthese sehr geeignet, wenn der Base die Möglichkeit zur Salzbildung gegeben wird (Beispiel: Eisessig). Langsamer und weniger vollständig bilden sich Flavine auch aus den freien Basen beim Erhitzen in hochsiedenden Lösungsmitteln wie Nitrobenzol.

Die Flavinsynthese ist auch mit substituierten Diaminen und mit monosubstituierten Alloxanen ausführbar und somit allgemeiner Anwendung fähig.

Von den im Pyrimidinring substitutierten Flavinen wird im experimentellen Teil die Darstellung des 3,9-Dimethylflavins, des einfachsten Vertreters derartiger Flavine, näher beschrieben. Dieser Farbstoff wurde in cm langen, orangegelben Nadeln durch Kondensation von N-Methyl-o-phenylendiamin-Chlorhydrat mit Methyl-alloxan erhalten. In Uebereinstimmung mit den angenommenen Formeln gelang es, denselben Farbstoff (VIII) auch aus dem 9-Methyl-flavin darzustellen, indem ich dessen rotes Silbersalz der Einwirkung von Jodmethyl unterwarf.

Erhitzt man 9-Methyl-flavin mit 20-proz. Natronlauge im Rohr auf 150° (4 Stdn.), so entsteht eine sauerstoffreie Base, deren Chlorhydrat bei 191° schmilzt und mit dem Chlorhydrat des N-Methyl-o-phenylendiamins (Schmp. 192°) identisch ist. Es gelingt somit unter diesen Bedingungen beide Heteroringe des Flavinmoleküls hydrolytisch aufzuspalten. Damit ist eine beim Abbau des Vitamins B_2 von R. Kuhn und H. Rudy[1]) aufgefundene Reaktion auch an einem synthetischen Farbstoff verwirklicht.

Das Lumilactoflavin konnte nun ebenfalls erhalten werden[8]) nach der eingangs beschriebenen Flavinsynthese. Es wurde das 1,2-Dimethyl-4-amino-5-methyl-amino-benzol[8a]) in salzsaurer Lösung mit Alloxan kondensiert. Das synthetisch gewonnene Lumilacoflavin stimmt mit dem aus Milch gewonnenen in allen unter-

[8]) zuerst veröffentlicht von R. Kuhn, K. Reinemund und F. Weygand, B. *67*, 1460 (1934). Die genaue Beschreibung der Synthese findet sich bei R. Kuhn und K. Reinemund, B. *67*, 1932 (1934).

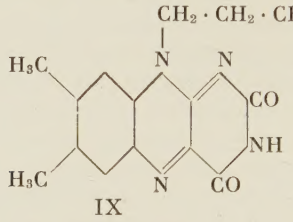
[8a]) von Hrn. K. Reinemund dargestellt.

suchten Eigenschaften überein: Farbe, Fluorescenz, Schmelzpunkt, Löslichkeit, Beständigkeit gegen Brom, Reduktion durch Natriumhydrosulfit, rotes Radikal bei Reduktion in mineralsaurer Lösung, optische Inaktivität, bitterer Geschmack. Da sowohl der natürliche, als auch der synthetische Farbstoff unter starker Zersetzung schmilzt, wurde dem Mischschmelzpunkt beider Präparate keine große Bedeutung beigemessen. Ich habe daher den synthetischen Farbstoff auch noch der alkalischen Hydrolyse zur Oxo-carbonsäure $C_{12}H_{12}N_2O_3$ und einer anschließenden thermischen Decarboxylierung zum „Sublimat" $C_{11}H_{12}N_2O$ unterworfen. Beide Abbauprodukte haben sich nach Schmp. und Mischschmp. mit den entsprechenden Derivaten des Vitamins B_2 identisch erwiesen. Die Oxo-carbonsäuren schmelzen zwar noch unter Aufschäumen, die Decarboxylierungsprodukte aber unzersetzt, und man erhält unveränderte Schmelzpte. und Mischschmpte., wenn die erstarrten Schmelzen neuerlich erhitzt werden. Um zu prüfen, ob bei derartigen Verbindungen geringfügige Umstellungen der Substituenten merkliche Schmelzpunktserniedrigungen bewirken, habe ich die Oxo-carbonsäure aus synthetischem 6, 8, 9-Trimethyl-flavin, die bei 210° schmolz, mit der Oxocarbonsäure aus natürlichem 6, 7, 9-Trimethyl-flavin gemischt. Das Gemisch schäumte bei 197° auf. Die Umstellung eines Methyls zwischen den Plätzen 7 und 8 macht sich also bei der Mischprobe sehr deutlich bemerkbar. Um schließlich beide Flavine auch ohne Abbaureaktionen identifizieren zu können, habe ich das 3, 6, 7, 9-Tetramethyl-flavin synthetisiert durch Kondensation von 1,2-Dimethyl-4-amino-5-methyl-amino-benzol mit der Natriumbisulfitverbindung des Methyl-alloxans (aus Theobromin). Der synthetische Farbstoff gab keine Depression mit dem von R. Kuhn und H. Rudy[9]) dargestellten Einwirkungsprodukt von Dimethyl-sulfat auf Lumilactoflavin: synth. 291°, natürlich 291°, Gemisch 291° (korr.).

Die synthetische Erschließung der Flavine ermöglichte es, der Frage näher zu treten, welche chemischen Gruppen des Lactoflavins für die biologische Wirksamkeit wesentlich sind. Diese Frage wurde zu klären versucht 1) durch Weglassung der 6,7-ständigen Methylgruppen im Benzolkern, durch Umstellung der Methyle und durch Einführung andersartiger Substituenten, 2) durch Aenderung der Konstitution und der Konfiguration der in 9-Stellung haftenden zuckerähnlichen Seitenkette. Ueberdies war zu prüfen, ob und in welchem Ausmaße die Anwesenheit acety-

[9]) B. *67*, 1125 (1934).

lierbarer Hydroxylgruppen in der N-ständigen Seitenkette überhaupt erforderlich ist. Nachdem diesbezüglich nur bekannt war, daß Lumilactoflavin in Gaben bis zu 50 γ pro Tag und Ratte ohne Wachstumswirkung ist[10]), habe ich das 6,7-Dimethyl-9-n-amyl-flavin, $C_{17}H_{20}N_4O_2$ (IX) synthetisch dargestellt, dessen Bruttoformel sich von derjenigen des Lactoflavins nur durch den Mindergehalt von 4 O-Atomen unterscheidet, und das keine acetylierbaren Hydroxyle enthält.



IX

Unter der Annahme, daß die zuckerähnliche Seitenkette des Lactoflavins die von R. Kuhn, H. Rudy und Th. Wagner-Jauregg[11]) bereits im Jahre 1933 vorgeschlagene Konstitution —C(HOH) · C(HOH) · C(HOH) · CH_2OH besitzt, die auf Grund der Lumilactoflavinbildung durch eine CH_2-Gruppe mit dem 9-ständigen N-Atom verknüpft ist, wurde versucht, ausgehend von durch Reduktion der Pentoseoxime erhältlichen Aminen $H_2N \cdot CH_2 \cdot (CH \cdot OH)_3 \cdot CH_2 \cdot OH$ Flavine mit Hydroxylgruppen in der 9-ständigen Seitenkette darzustellen. Schwierigkeiten, welche die Umsetzung dieser empfindlichen Basen mit Halogen-o-nitro-benzolen und Halogen-o-nitro-xylolen bot, sind durch Anwendung basischer Kondensationsmittel, insbesondere tertiärer Amine (Pyridin) überwunden worden. Die Reduktion der so erhaltenen Nitro-basen (X) zu den entsprechenden Diaminen (XI) wurde anfangs in Gegenwart von überschüssigem Alloxan ausgeführt ($SnCL_2$), so daß sich unmittelbar die gesuchten Farbstoffe bzw. Leukoverbindungen derselben bilden konnten. (Bei späteren Versuchen wurde getrennt reduziert und kondensiert). Wurde bei dieser Reduktion ein Ueberschuß an Reduktionsmittel angewandt, so entstanden farblose Lösungen, aus denen der Ueberschuß des Reduktionsmittels durch geeignete Oxydationsmittel (z. B. verd. Kaliumpermanganat) entfernt wurde. Beim anschließenden Schütteln mit Luftsauerstoff wurden dann die gebildeten

[10]) P. György, R. Kuhn und Th. Wagner-Jauregg, Naturwiss. *21*, 560 (1933); Klin. Wochschr. *12*, 1241 (1933).
[11]) B. *66*, 1950, (1933).

Leuko-flavine dehydriert und gelbe Lösungen erhalten, die in essigsaurer Lösung intensiv grün fluorescierten und keinen Farbstoff an Chloroform abgaben. Zur Reinigung dienten die von der Isolierung des Lactoflavins her bekannten Verfahren (Adsorp-

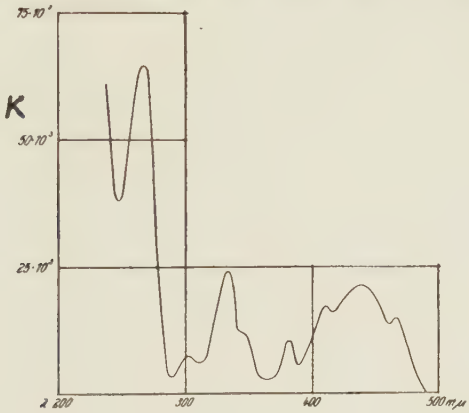
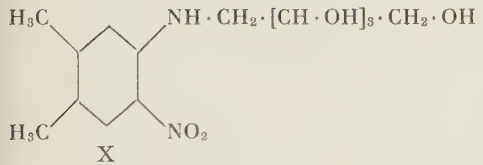
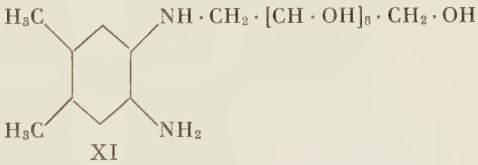


Abbildung 1.

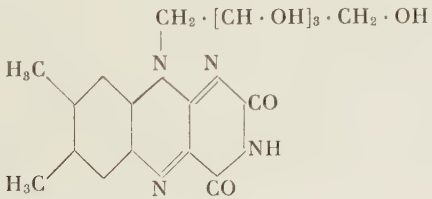
$$K = \frac{2{,}30}{c \cdot d} \log \frac{Jo}{J}$$



X



XI

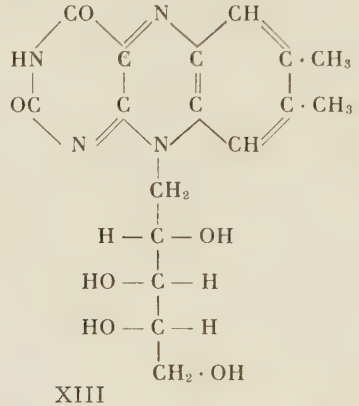


XII

tion an Fullererde usw.). Die so gereinigten synthetischen Farbstoffe konnten durch Pyridin und Essigsäureanhydrid in die chloroformlöslichen Tetraacetyl-Verbindungen übergeführt werden, die aus Essigester in orangegelben Nädelchen krystallisiert erhalten wurden. Die synthetischen Farbstoffe verhalten sich genau wie Lactoflavin in Bezug auf Löslichkeit, Bildung von Lumiflavin beim Belichten der alkalischen Lösung, Absorptionsspek-

trum, p_H-Abhängigkeit der Fluorescenz, Bildung eines roten Radikals bei der Reduktion in mineralsaurer Lösung.

Von den synthetischen Farbstoffen der Lactoflavingruppe wurde an B_2-arm ernährten Ratten an erster Stelle geprüft der aus l-Arabinose gewonnene Farbstoff $C_{17}H_{20}N_4O_6$, dem auf Grund der Synthese Formel XIII zukommt.



XIII

Gefüttert wurde die Tetraacetyl-Verbindung. Diese zeigte bei den ersten Versuchen etwa dieselbe Wachstumswirkung wie das natürliche Lactoflavin. Dagegen zeigte der ebenfalls aus l-Arabinose synthetisierte Farbstoff $C_{15}H_{16}N_4O_6$, dem gegenüber XIII nur die beiden am Benzolkern haftenden Methylgruppen fehlen, in biologischen Versuchen keine Wachstumswirkung.

Unter den 8 stereoisomeren 6,7-Dimethyl-9-(tetra-oxy-n-amyl)-flavinen ließ sich schon nach der Synthese des 6,7-Dimethyl-9-l-araboflavins eine engere Auswahl treffen auf Grund des optischen Drehungsvermögens. Das natürliche Lactoflavin ist in n/20 Natronlauge linksdrehend. Das spezifische Drehungsvermögen $[\alpha]_D^{20^\circ} = -115^\circ$ stimmt für Präparate aus Milch[12]), Leber[13]) und Luzerne[14]) innerhalb der Fehlergrenzen überein. Das synthetische 6,7-Dimethyl-9-l-araboflavin ist nun ebenfalls linksdrehend. Polarimetrisch geprüft wurden zuerst zwei Präparate, von denen das eine aus dem p-Toluol-sulfon-säure-ester des 1,2-Dimethyl-4-nitro-5-oxy-benzols und das andere aus 1,2-Dimethyl-4,5-dinitro-benzol durch Kondensation mit l-Arabin-

[12]) R. Kuhn nach Messungen von Th. Wagner-Jauregg, IX. Congreso internacional de Quimica, Madrid, April 1934.
[13]) R. Kuhn und Th. Wagner-Jauregg, B. *67*, 1770 (1934).
[14]) R. Kuhn und H. Kaltschmitt, B. *68*, 128 (1935).

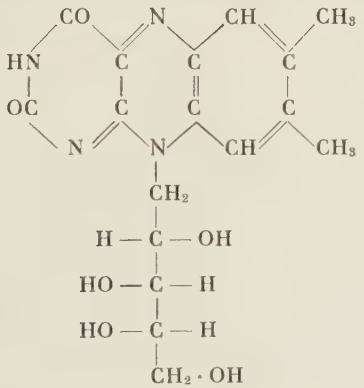
amin usw. bereitet war. Die folgenden Bestimmungen sind mit der Tetraacetylverbindung in n/20 Natronlauge ausgeführt, wobei aber in wenigen Sekunden Verseifung zu dem freien Farbstoff eintritt. Die Werte sind auf freien Farbstoff umgerechnet.

Präparat I: $[\alpha]_D^{20^\circ} = (-0{,}10^\circ \cdot 100) : (0{,}079 \cdot 1) = -127^\circ$

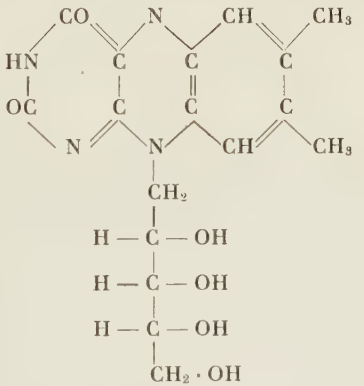
Präparat II: $[\alpha]_D^{20^\circ} = (-0{,}16^\circ \cdot 100) : (0{,}145 \cdot 1) = -110^\circ$

Das Drehungsvermögen stimmte somit zunächst innerhalb der Fehlergrenzen mit demjenigen des Lactoflavins überein.

Die l-Arabinose, von der die Synthese ausgegangen war, dreht stark rechts; der Uebergang zur starken Linksdrehung des Flavins vollzieht sich bereits bei der Bildung des l-Arabin-amins, das schwach linksdrehend ist. Zur Synthese des natürlichen Vitamins B_2 kamen nun unter der Annahme, daß die dem Chromophor benachbarte Hydroxylgruppe über den Sinn der Drehung entscheidet neben der l-Arabinose die d-Xylose, l-Lyxose und d-Ribose in Betracht. Mit Sicherheit auszuschließen war d-Arabinose. Neben der l-Arabinose wurde besonders in Betracht gezogen die d-Ribose, wonach dem Lactoflavin die Formel XIV oder XV zugekommen wäre. Tatsächlich stellte sich später heraus, daß das natürliche Lactoflavin ein 6,7-Dimethyl-9-d-riboflavin ist.



XIV



XV

Das synthetische 6,7-Dimethyl-9-l-araboflavin (XIV) wurde in orientierenden Versuchen auf sein Kupplungsvermögen mit dem kolloiden Träger des gelben Fermentes von O. Warburg und W. Christian geprüft. Als kolloider Träger dienten bis einschließlich der Chloroformstufe nach O. Warburg und W. Christian gereinigte Fermentpräparate aus Hefe, aus denen durch Dialyse

gegen ganz verd. Salzsäure nach H. Theorell[15]) die Farbstoffkomponente entfernt war. Es ergab sich, daß solche Eiweißlösungen bei neutraler Reaktion den Farbstoff nur zu einem sehr geringen Teil zu binden vermögen. In quantitativen Versuchen, die Hr. Th. Wagner-Jauregg vergleichend mit Lactoflavin ausgeführt hat, ergab sich, daß dieser geringe Effekt durchaus unspezifisch ist und die katalytischen Wirkungen (Hexose-monophosphorsäure, l-Aepfelsäure), die zu erwarten waren, wenn der synthetische Farbstoff oder auch der natürliche die wirksame Gruppe des gelben Fermentes im Versuch von H. Theorell ersetzt hätte, ausblieben. Später teilte nun H. Theorell[16]) mit, daß auch der aus reinem (krystallisiertem) gelben Ferment gewonnene Eiweißkörper mit Lactoflavin nicht reagiert. Er hat entdeckt, daß bei der Denaturierung des gelben Fermentes neben der Farbstoffkomponente noch 1 Mol Phosphorsäure auftritt. Die Vorstellung von R. Kuhn[17]), daß im Lactoflavin ein Pro-ferment vorliegt, kann auch in Anbetracht der ergebnislosen Paarungsversuche mit dem kolloiden Träger in vitro bestehen bleiben, wenn man annimmt, daß nicht Lactoflavin selbst, sondern eine Lactoflavinphosphorsäure die „wirksame Gruppe" des Fermentes darstellt. Da im Tierversuch schon das Lactoflavin selbst als wirksame Gruppe in Erscheinung tritt, ist anzunehmen, daß dem Organismus nicht nur die Paarung dieses Vitamins mit einem Protein, sondern auch die Veresterung mit Phosphorsäure überlassen bleibt: Vitamin + Phosphorsäure + Protein $\rightleftharpoons$ Ferment.

Aus seiner Entdeckung hat nun H. Theorell den Schluß gezogen, daß die Wirkungsgruppe des gelben Fermentes ein „Nucleotid" ist, in dem an Stelle eines Purins das 6,7-Dimethyl-alloxazin vorkommt. Auf Grund der durchgeführten Synthesen dürfte es ausgeschlossen sein, daß dem gelben Ferment das 6,7-Dimethyl-alloxazin zu Grunde liegt, vielmehr für bewiesen, daß die farbige Stammsubstanz das 6,7-Dimethyl-iso-alloxazin ist. Der große spektroskopische Unterschied zwischen Alloxazinen und Flavinen und die nahe spektroskopische Uebereinstimmung zwischen den synthetischen Flavinen und dem gelben Ferment lassen daran keinen Zweifel. Würde sich das Ferment vom Alloxazin ableiten, so könnte die zuckerähnliche Seitenkette — wenn man nicht ammoniumsalz-artige Bindung annehmen will — nicht in

---

[15]) Bioch. Z. *272*, 155 (1934).
[16]) Bioch. Z. *275*, 37 (1934).
[17]) Naturwiss. 21, 561 (1932); Mitt. der Kaiser-Wilhelm-Ges. *2*, 13 (1933).

9-Stellung befinden, und sie müßte bei der Abspaltung des Proteins erst an diesen Ort wandern, was sehr unwahrscheinlich ist. Im Gegensatz zu den Nucleosiden läßt sich die zuckerähnliche Seitenkette des Lactoflavins nicht hydrolytisch abspalten[18]) Dieser grundsätzliche Unterschied schließt natürlich etwaige genetische Beziehungen zu echten Nucleotiden nicht aus. Vielleicht ist bei gelben Fermenten verschiedener Herkunft auch die noch unbekannte Stellung des Phosphorsäurerestes verschieden, wie bei den Adenylsäuren aus Hefe und Muskel.

Der Mangel an Hydroxylgruppen, welche für die Veresterung der Phosphorsäure in Frage kommen, macht es verständlich, daß das synthetische 6,7-Dimethyl-9-n-amyl-flavin auch in Gaben von 100 γ je Tag keine Wachstumswirkung an B_2 arm ernährten Ratten zeigt.

Das 6,7-Dimethyl-9-l-arabo-flavin zersetzt sich wie Lactoflavin unter Dunkelfärbung und Aufschäumen etwa 2° höher als dieses, bei 295°. Mischproben mit verschiedenen Lacto-flavin-Präparaten ergaben keine Depression. Das Aufschäumen erfolgte stets bei der Temperatur, bei der sich das Lactoflavin allein zersetzte. Auch beim Vergleich der Kinetik der alkalischen Photolyse von Lactoflavin und 6,7-Dimethyl-9-l-arabo-flavin ergab sich übereinstimmendes Verhalten. Die Halbwertszeiten stimmen praktisch überein. (Vergl. Abbildung 2).

Trotz dieser weitgehenden Aehnlichkeiten können Lactoflavin und 6,7-Dimethyl-9-l-araboflavin nicht identisch sein. Die Tetraacetylverbindung des synthetischen Farbstoffs schmilzt nämlich schon bei 217° (Tetraacetyl-lactoflavin 243°) und der Schmp. konnte auch durch wiederholte chromatographische Reinigung nicht weiter erhöht werden. Ein bedeutender Unterschied trat dann auch hinsichtlich der biologischen Wirksamkeit an B_2 arm ernährten Ratten zu Tage. Die Wachstumswirkung des synthetischen Farbstoffs ist nämlich, auch wenn man nur die günstigsten Fälle (Abbildung 4) betrachtet, mindestens 3-mal geringer als die des Lactoflavins. Die mit 15 und 30 γ erzielten Gewichtszunahmen sind schon durch 5 und 10 γ Lactoflavin zu erreichen, ja zu überbieten. Der aus l-Arabinose synthetisierte Farbstoff besitzt offenbar nur bis zu einem gewissen Grade die Fähigkeit als „Ersatz" des natürlichen Vitamins B_2 zu wirken.

In der Absicht, den Einfluß der Spiegelbild-Isomerie auf die biologischen Wirkungen der Flavine kennen zu lernen, wurde neben dem 9-l-Arabo-flavin auch die d-Verbidunng und die d,l-

---

[18]) R. Kuhn und Th. Wagner-Jauregg B. *66*, 1577 (1933).

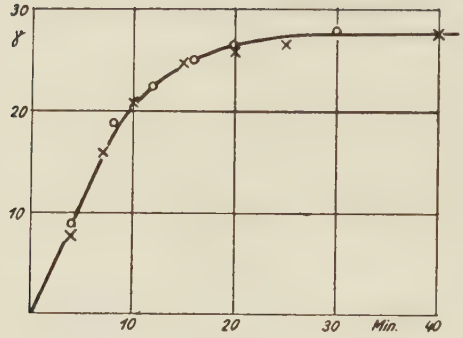


Abbildung 2.

Kinetik der alkalischen Photolyse
O 6,7-Dimethyl-9-l-araboflavin
× Lactoflavin

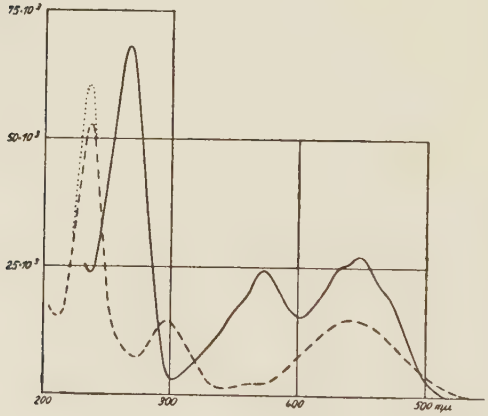


Abbildung 3.

——— 6,7-Dimethyl-9-l-araboflavin in Wasser (c=2.99×10⁻⁴ Mol)
- - - 1,2-Dimethyl-4-nitro-5-[l-1'-arabityl-amino]-benzol in 80% Alkohol (c=5.62×10⁻⁴ Mol/Liter)
.. ... 1,2-Dimethyl-4-nitro-5-methylamino-benzol in 80% Alkohol (c=8.82×10⁻⁴ Mol/Liter. d immer = 0.114 cm)

$$\text{Ordinate } K = \frac{2{,}30}{c \cdot d} \cdot \log \frac{Jo}{J}$$

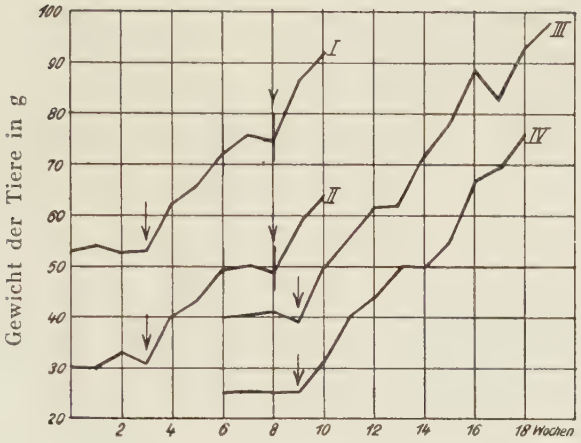


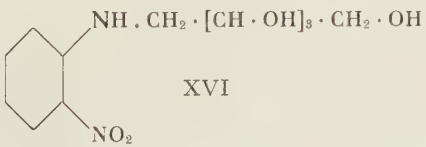
Abbildung 4.

Wachstumswirkung von 6,7-Dimethyl-9-l-araboflavin.

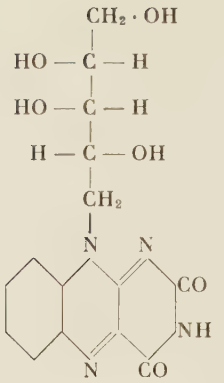
I und II: Je 30 γ freier Farbstoff (von der 6.—8. Woche ohne Farbstoff)

III und IV: Je 22 γ Tetraacetylfarbstoff = 15 γ freier Farbstoff.

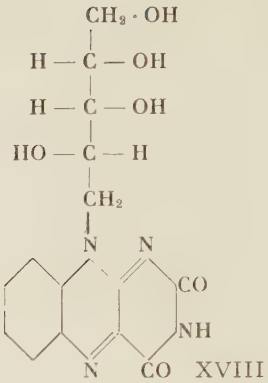
Verbindung hergestellt. Die Kondensation von d- und l-Arabinamin mit o-Dinitrobenzol in alkoholischer Lösung lieferte die gesuchten 1-Nitro-2-(1'arabityl-amino)-benzole (XVI) in einer Ausbeute von 65% d. Th. Aus diesen wurden durch katalytische Hydrierung der Nitrogruppe mit Palladium und Wasserstoff und anschließende Kondensation der dabei erhaltenen N-mono-substituierten o-Diamine mit Alloxan die Flavine XVII und XVIII in einer Ausbeute von 64% d. Th. erhalten. In Tabelle 1 sind die Schmelzpunkte der optisch aktiven Zwischenprodukte und der entsprechenden d,l-Verbindungen neben denen der spiegelbildlichen Flavine und ihrer Tetraacetylverbindungen verzeichnet.



XVI



XVII



XVIII

Tabelle 1.

	d-	*d,l*-	*l*-
Arabinamin-Oxalate	190—191°	164—165°	190—191°
1-Nitro-2-[1'-arabityl-amino]-benzole	187—188°	168—169°	187—188°
1-Nitro-2-[2'.3'.4'.5'- tetraacetyl - arabityl-1'-amino]-benzole . . .	126—127°	146—147°	126—127°
9-Arabo-flavine	296° (Zers.)	296° (Zers.)	296.5° (Zers.)
Tetraacetyl-9-araboflavine . . .	266° (Zers.)	274° (Zers.)	266° (Zers.)

Man erkennt, daß der inaktive Nitrokörper (XVI) niedriger (19°) schmilzt als die Antipoden, während die aktiven Tetraacetylverbindungen von XVI im Gemisch 1:1 eine Schmelzpunktserhöhung (20°) geben. Dasselbe ist bei den Tetraacetylflavinen der Fall. Die freien, spiegelbildlichen Flavine und das d,l-Flavin zeigen den gleichen Schmp. (296° u. Zers.).

Das Drehungsvermögen der 9-Araboflavine in n/10 Natronlauge ist wie dasjenige des Lactoflavins[19]) von der Konzentration stark abhängig und erleidet durch Zusatz von Borsäure eine Aenderung des Vorzeichens.

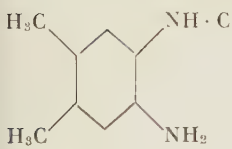
Tabelle 2: Drehungsvermögen der 9-Arabo-flavine; Natrium-Linie (Spektroskop); l = 1 dm.

	α_D^{17}	(c%)	$[\alpha]_D^{17}$	Lösungsmittel
d-Flavin (XVII) . .	+0.42°	0.503	+83.5°	$n/_{10}$-NaOH
	+0.19°	0.251	+75.5°	„
	+0.08°	0.126	+64.0°	„
	—0.22°	0.126	—175°	$n/_{20}$-NaOH + ges/$_2$ Borax
l-Flavin (XVIII) . .	—0.56°	0.678	—82.5°	$n/_{10}$-NaOH
	—0.25°	0.339	—74°	„
	—0.11$_5$°	0.169	—68°	„
	+0.59°	0.339	+174°	$n/_{20}$-NaOH + ges/$_2$ Borax

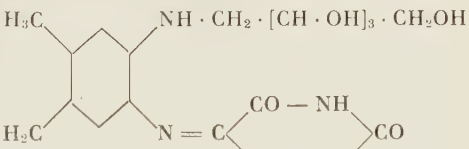
[19]) R. Kuhn, H. Rudy und F. Weygand B. *68*, 625 (1935).

Bis zu 80 γ geprüft sind d- und l-9-Araboflavin ohne Wachstumswirkung an B_2 arm ernährten Ratten. Die Bedeutung der 6,7-ständigen Methylgruppen für die Wachstumswirkung des 6,7-Dimethyl-9-l-araboflavins ist somit sehr ausgeprägt.

Die Ausbeuten bei der Flavinsynthese sind stark abhängig von den Substituenten am aromatischen Kern und am N-Atom der N-monosubstituierten o-Diamine, die der Kondensation mit Alloxan in saurer Lösug unterworfen werden. Bei der von R. Kuhn und K. Reinemund näher ausgearbeiteten Synthese des Lumilactoflavins[20]), die das Photoderivat des Vitamins B_2 in einer Ausbeute von 94% d. Th. lieferte, trat noch keine Störung durch die 6,7-ständigen Methylgruppen auf. Wird aber gleichzeitig noch die 9-ständige Methylgruppe durch die zuckerähnliche Seitenkette eines Pentits ersetzt, so fallen die Ausbeuten auf etwa 5—10% d. Th. Die Methyle in 6,7-Stellung sind hier für die schlechten Ausbeuten noch mehr verantwortlich als die Pentitkette, denn d- und l-9-Araboflavin konnten immerhin noch in Ausbeuten von über 50% d. Th. erhalten werden. Bei Anwesenheit der genannten Substituenten liefern die o-Diamine XIX mit Alloxan auch in saurer Lösung ganz überwiegend hellgelbe, schön krystallisierende Kondensationsprodukte, die um 1 Mol H_2O reicher sind als die gesuchten Flavine. Die einfachsten Analoga dieser Verbindungen denen vermutlich die Konstitution XX zukommt, hat



XIX



XX

schon O. Kühling[2]) in Händen gehabt, der die Kondensation von N-monosubstituierten o-Diaminen mit Alloxan in neutraler Lösung ausgeführt hat. Da in den einfachsten Fällen schwache Säuren (Essigsäure) genügen, um die Bildung der „Kühling"-Produkte quantitativ zu unterdrücken, war es naheliegend, die Kondensation in möglichst saurer Lösung auszuführen. Ich mußte jedoch feststellen, daß selbst durch Anwendung von Ueberchlorsäure eine nennenswerte Steigerung der Flavinausbeuten nicht gelingt. Ein zweiter, naheliegender Weg war, aus den in guter Ausbeute erhältlichen „Kühling"-Produkten in einem getrennten Arbeitsgang noch 1 Mol H_2O abzuspalten. Alle diesbezüglichen Ver-

[20]) R. Kuhn und K. Reinemund B. *67*, 1932 (1934).

suche zur Synthese des Lactoflavins und seiner Isomeren sind aber bis heute fehlgeschlagen. Wie schon am einfachsten Beispiel, nämlich der Kondensation von N-Methyl-o-phenylendiamin mit Alloxan eingangs der Arbeit gezeigt wurde, verläuft die Synthese von Flavinen (Abspaltung von 2 H_2O) nicht über die „Kühling"-Produkte (Abspaltung von 1 H_2O).

In einer systematischen Untersuchung über den Einfluß der am aromatischen Kern haftenden Substituenten (wobei am N stets Methyl sitzt) hat Hr. A. H. Cook[21]) gefunden, daß vereinzelt durch Zusatz von Borsäure eine außerordentliche Steigerung der Flavinausbeuten möglich ist. Bei den o-Diaminen der Formel XIX liegen die Verhältnisse genau so. Die Ausbeuten an Lactoflavin und seinen Isomeren werden fast 10-mal größer, wenn man die entsprechenden o-Diamine mit Alloxan in Gegenwart von Borsäure kondensiert. Schon in den ersten Versuchen wurden Ausbeuten von 65—75% d. Th. an Rohflavin und 55—65% d. Th. an reinem Farbstoff erhalten; weitere Versuche lieferten 95% d. Th.[22]).

Die überraschende Wirkung der Borsäure beruht allem Anschein nach nicht auf Komplexbildung mit den Hydroxylen der zuckerähnlichen Seitenkette. Dies geht aus folgenden Versuchen hervor: Lactoflavin bildet schon in verd. wässriger Lösung mit Borsäure Komplexe, die sich durch starke Rechtsdrehung ($[\alpha]_D^{20°} = +350°$) vom freien, linksdrehenden Vitamin ($[\alpha]_D^{20°} = -110°$) sofort unterscheiden lassen. In verd. wässriger Lösung hat aber die Borsäure keinen Einfluß auf die Synthese, wobei zu berücksichtigen ist, daß diese in saurer Lösung stattfindet. Die Wirkung der Borsäure tritt vielmehr, wie ich gefunden habe, in wasserfreien Lösungsmitteln (wie Eisessig) am stärksten in Erscheinung. Borsäure begünstigt auch die Synthese von Flavinen, die keine hydroxylhaltige, zur Bildung von Komplexen geeignete Seitenkette tragen, oft in hohem Maße. An Stelle von Borsäure-Eisessig kann man mitunter auch eine Lösung von krystallisiertem Pyro-boracetat, das aus Borsäure und Essigsäureanhydrid leicht erhältlich ist, in Eisessig verwenden.

Von den nach dem Borsäureverfahren erhaltenen Flavinen sei zunächst eingehender das d-, l- und d,l-6,7-Dimethyl-9-araboflavin beschrieben. Ueber die l-Verbindung ist schon an früherer Stelle in dieser Arbeit einiges mitgeteilt worden. Die Schmelz-

---

[21]) R. Kuhn und A. H. Cook, unveröffentlicht.

[22]) Diese Ausbeute-Angaben beziehen sich auf die eingewogene Menge o-Nitroxylidin (in Formel XIX NO_2 statt NH_2).

punkte der optisch-aktiven und racemischen Zwischenkörper und Flavine sind in folgender Tabelle verzeichnet.

Tabelle 3: Schmelzpunkte (k. Th., unkorr.) der aktiven und racem. Verbindungen.

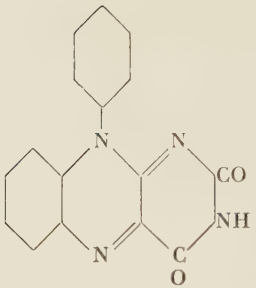
	d-	*d,l-*	*l-*	
1.2-Dimethyl-4-nitro-5-[1'-arabityl-amino]-benzole	213—214°	203—204°	213—214°	
1.2-Dimethyl-4-nitro-5-[2' 3' 4'.5'-tetraacetyl-arabityl-1'-amino]-benzole	113—114°	143—144°	113—114°	
6.7-Dimethyl-9-arabo-flavine	302—303°	295—296°	302—303°	u. Zers.
Tetraacetyl-6.7-dimethyl-9-araboflavine	221—222°	283—284°	221—222°	u. Zers.

Wie bei den nichtmethylierten Araboflavinen schmilzt die d,l-Verbindung der acetylierten Zwischenprodukte und die d,l-Verbindung der Tetraacetyl-flavine wesentlich höher (30 bzw. 62°) als die Komponenten. Im Gegensatz zu den nicht methylierten Farbstoffen geben d- und l-6,7-Dimethyl-9-araboflavin eine geringe Depression (etwa 7°), wobei zu berücksichtigen ist, daß es sich wie beim Lactoflavin um Zersetzungspunkte handelt. Das Drehungsvermögen in n/10 Natronlauge ist von der Konzentration der Farbstoffe abhängig und erleidet durch Zusatz von Borax eine Aenderung des Vorzeichens.

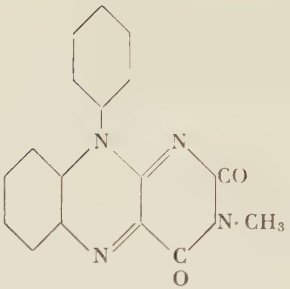
Tabelle 4: Drehungsvermögen der 6,7-Dimethyl-9-arabo-flavine. Natriumlinie (Spektroskop) l = 1 dcm.

	α_D^{20}	(c%)	$[\alpha]_D^{20}$	
	+0,40°	0,509	+78,6°	$n/_{10}$-NaOH
6,7-Dimethyl-9-d-arabo-flavin	+0,18°	0,254	+70,9°	„
	+0,08°	0,127	+63,0°	„
	—1,12°	0,254	—441°	$n/_{20}$-NaOH + ges/$_2$Borax
	—0,38°	0,488	—77,5°	$n/_{10}$-NaOH
6,7-Dimethyl-9-l-arabo-flavin	—0,17°	0,244	—69,7°	„
	—0,07°	0,122	—57,4°	„
	+1,09°	0,244	+448°	$n/_{20}$-NaOH + ges/$_2$ Borax

Das Borsäureverfahren macht auch Flavine, die in 9-Stellung Aryle tragen, leicht zugänglich. Ich beschreibe im Versuchsteil die Synthese des 9-Phenyl-flavins XXI und des 3-Methyl-9-phenyl-flavins XXII, die in Ausbeuten von über 60% d. Th. direkt auskrystallisieren, während sie sich in Eisessig ohne Borsäure unter denselben Bedingungen nur in so geringen Mengen bilden, daß keine Ausscheidung erfolgt.



XXI



XXII

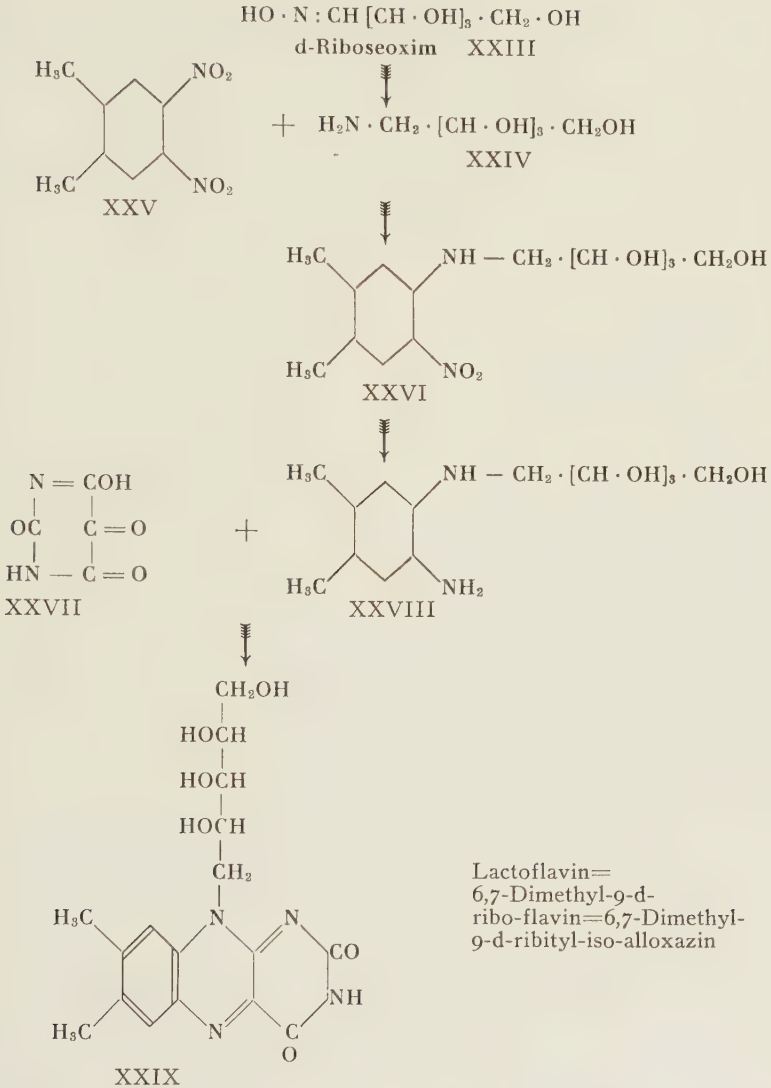
Nachdem es sich gezeigt hatte, daß das 6,7-Dimethyl-9-l-araboflavin nicht mit Lactoflavin identisch war, kam mit großer Wahrscheinlichkeit das 6,7-Dimethyl-9-d-ribo-flavin in Frage. Dieses erschien zugänglich nach meiner eingangs der Arbeit mitgeteilten Flavinsynthese durch Kondensation von 1,2-Dimethyl-4-amino-5-(d-1'-ribityl)-amino-benzol (XXVII) mit Alloxan. Dieser Versuch hat der Erwartung gemäß sowohl in Zürich[23]), wie in Heidelberg[24]) zu einem Flavin geführt, das mit dem von R. Kuhn und Mitarb.[25]) aus Milch isolierten Lactoflavin identisch ist. Führt man die Kondensation nach meiner Arbeitsweise mit der berechneten Menge Alloxan in Eisessig unter Zusatz von Borsäure bei 15—20° aus, so erhält man das Vitamin in einer Ausbeute von 90—95% d. Th. sofort in kryst. Zustand, und schon nach einmaligem Umkrystallisieren aus abs. Alkohol stimmen alle physikalischen, chemischen und biologischen Eigenschaften mit denen des Naturproduktes genau überein. Die bei Ausbeuten von unter 10% d. Th. in den ersten Synthesen noch erforderliche Reinigung durch wiederholte Adsorption und Elution ist durch das Borsäureverfahren entbehrlich geworden. Die noch vorhandenen Verluste von 5—10% d. Th. sind auf die eingewogenen Mengen 1,2-Dimethyl-4-nitro-5-(d-1'-ribityl-amino)-benzol berechnet und vorwiegend auf die Empfindlichkeit des Diamins zurückzuführen, das als Zwischenprodukt gleich weiter verarbeitet wurde.

---

[23]) P. Karrer, K. Schöpp und F. Benz, Helv. chim. Acta *18*, 426 (1935); H. v. Euler, P. Karrer, M. Malmberg, K. Schöpp, F. Benz und B. Becker, Helv. chim. Acta *18*, 522 (1935). Diese stellten das zur Kondensation mit Alloxan benötigte Diamin XXVII über andere Zwischenprodukte hinweg dar.

[24]) R. Kuhn, K. Reinemund, H. Kaltschmitt, R. Ströbele und H. Trischmann, Naturwiss. *23*, 260 (1935).

[25]) B. *66*, 1034 (1933).



Die Synthese des Diamins wurde von mir auf folgendem Wege ausgeführt: d-Ribose wurde mit Hydroxylamin in alkoholischer Lösung umgesetzt und das erhaltene d-Riboseoxim (XXIII) zum d-Ribamin (XXIV) reduziert. Dieses wurde mit 1,2-

Dimethyl-4,5-dinitro-benzol (XXV) in Alkohol zum 1,2-Dimethyl-4-nitro-5-(d-1'-ribityl-amino)-benzol (XXVI) kondensiert, das orangerote Prismen vom Schmp. 127° darstellt. Die katalytische Hydrierung der Nitrogruppe zur Aminogruppe bereitete keine Schwierigkeiten.

Tabelle 5: Vergleich von synthetischem und natürlichem Lactoflavin.

		synthet.	natürl.
Schmp. (k. Th.) unt. Zers.		292°	292°
Farbstärke der wässrigen Lösung[26]) für 0,100 mg in 1 ccm, Filter S 47		$\varepsilon = 3{,}23 \pm 0{,}15$	$\varepsilon = 3{,}20 \pm 0{,}15$
Lage der Hauptabsorptionsbanden[27]) in mμ (±1)		**445** mμ 359 „ **266** „ **221** „	**445** mμ 360—365 „ **265** „ **220** „
Drehungsvermögen[28]) in n/10-NaOH (l=1 dcm)	c=0,502	$[\alpha]_D^{23} = -116°$	$[\alpha]_D^{21} = -118°$
	c=0,251	„ $= -111°$	„ $= -112°$
	c=0,125	„ $= -96°$	„ $= -93°$
	c=0,062	„ $= -72°$	„ $= -72°$
Drehungsvermögen in n/20-NaOH + ges./2 Borax	c=0,125	$[\alpha]_D^{23} = +332°$	$[\alpha]_D^{21} = +333°$
Alkalische Photolyse[29]): Halbwertszeit in Min.[30])		$t = 8{,}0 \pm 0{,}3$	$t = 7{,}9 \pm 0{,}3$
Endwert der Photolyse[31])		$70 \pm 3\%$ d. Th.	$68 \pm 3\%$ d. Th.
Schmp. der Tetraacetylverb. (k. Th.)		242°	242°
Wachstumswirkung von 10 γ je Tag und Ratte		+1,43 g	+1,45 g

[26]) 1,396 mg Farbstoff in 20 ccm Wasser (d=2,5 mm) und in 100 ccm Wasser (d=2,5 mm). Stufenphotometer C. Zeiß.

[27]) Licht-elektrische Photometrie: je 1,396 mg Farbstoff in 20 ccm Wasser. Die schwächste der 4 Hauptbanden bei λ = etwa 360 mμ zeigt in ihrer Gestalt und Höhe bei natürlichen wie synthetischen Flavinen Schwankungen.

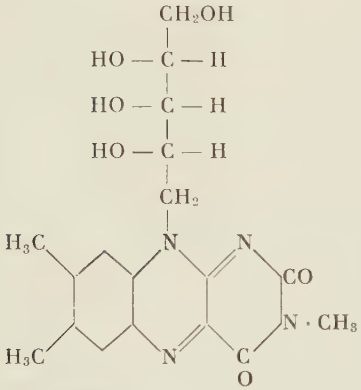
[28]) Für c=0,50 ist die Genauigkeit von $[\alpha]_D = \pm 3°$, für c=0,125 $[\alpha]_D = \pm 8°$.

[29]) Je 147 γ Farbstoff pro ccm 0,5 n Natronlauge aus etwa 30 cm Entfernung mit einer 500 Watt-Lampe bestrahlt. Von 3 zu 3 Min. wurden je 2 ccm mit der Pipette entnommen, zu 0,30 ccm Eisessig gegeben, mit Wasser verdünnt, 3-mal mit Chloroform ausgeschüttelt, durch trockenes Filter gegossen, mit Chloroform auf 10,0 ccm aufgefüllt und am Stufenphotometer abgelesen.

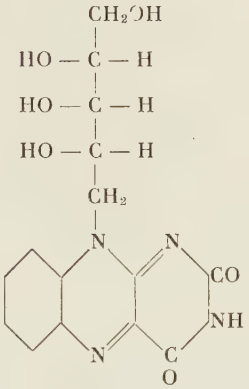
[30]) vergl. Abbildung 2.

[31]) Ausbeute an Lumilactoflavin.

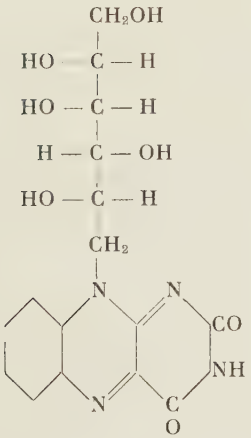
Das 6,7-Dimethyl-9-d-riboflavin schmolz bei 292° (k. Th.). mit Lactoflavin vom Schmp. 292° erfolgt keine Depression. Dasselbe gilt für die bei 242° schmelzenden Tetraacetyl-verbindungen, die auch in Krystallform und Löslichkeit keine Unterschiede erkennen lassen. Weitere in Tabelle 5 verglichene physikalische Konstanten stimmen ebenso wie die Wachstumswirkung an B_2 frei ernährten Ratten innerhalb der Fehlergrenzen überein. Damit ist die Konstitution des Lactoflavins im Sinne der Formel XXIX bewiesen.



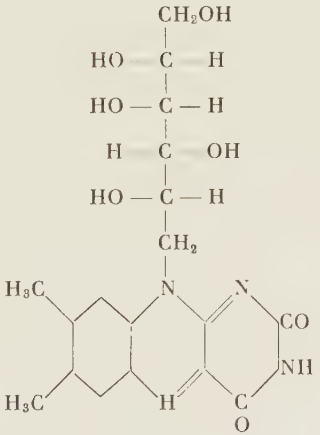
XXX



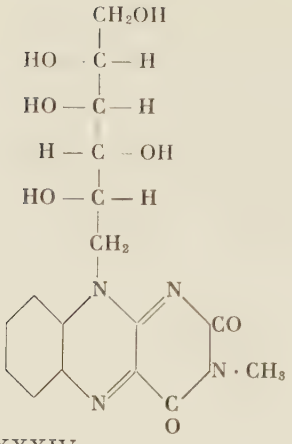
XXXI



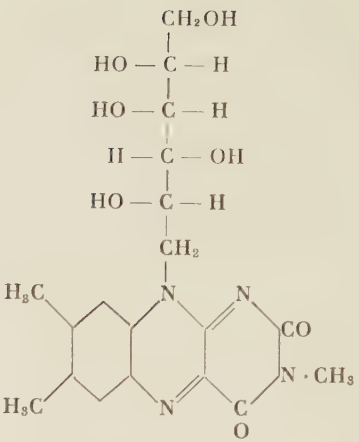
XXXII



XXXIII



XXXIV



XXXV

Einen Beitrag zur Spezifität des Lactoflavins bietet die Beobachtung, daß das 3, 6, 7-Trimethyl-9-d-ribo-flavin (3-Methyl-lactoflavin) und das 9-d-Ribo-flavin an B_2 frei ernährten Ratten in Gaben bis zu 50 γ geprüft unwirksam sind.

Das 3, 6, 7-Trimethyl-9-d-riboflavin (XXX) habe ich aus dem Diamin XXVII und Methylalloxan hergestellt, es zeichnet sich wie andere 3-Methyl-flavine durch besonders schöne Krystalle aus und zeigt den Schmp. 272° (k. Th. unt. Zers.)

Das 9-d-Riboflavin (XXXI) wurde über das Kondensationsprodukt aus d-Ribamin und o-Dinitrobenzol, Reduktion der Nitrogruppe des entstandenen 1-Nitro-2-(d-1'-ribityl-amino)-benzols (Schmp. 134,5—135,5°) und Kondensation des 1-Amino-2-(d-1'-ribityl-amino)-benzols mit Alloxan-Borsäure in Eisessig. dargestellt. Es schmolz bei 283—284° (k. Th. unt. Zers.)

Zur weiteren Prüfung der Frage, welche Flavine biologisch wirksam sind als Zusatzfaktor an B_2 frei ernährten Ratten, habe ich folgende vier Flavine mit einem Hexoserest dargestellt: 1) 9-d-Glucoflavin XXXII, 2) 6,7-Dimethyl-9-d-gluco-flavin XXXIII, 3) 3-Methyl-9-d-gluco-flavin XXXIV und 4) 3, 6, 7-Trimethyl-9-d-gluco-flavin XXXV.

Das zur Herstellung dieser Flavine benötigte d-Glucamin war nach M. Roux[32]) durch Reduktion des d-Glucoseoxims mit Natriumamalgam hergestellt worden. Es wurde mit o-Dinitrobenzol und 1,2-Dimethyl-4,5-dinitro-benzol zu den entsprechenden Nitro-

[32]) M. Roux Ann. chim. (8) *1*, 165 (1904).

basen kondensiert. Nach Reduktion der Nitrobasen und Kondensation der entstandenen Diamine mit Alloxan bzw. Methyl-alloxan in Borsäure-Eisessig-Lösung wurden die Flavine XXXII bis XXXV erhalten. Diese erwiesen sich jedoch alle als unwirksam an B_2 frei ernährten Ratten in Tagesdosen bis zu 50 γ geprüft. In Tabelle 6 sind die Konstanten der Zwischenprodukte, sowie die der Flavine und von Derivaten derselben, soweit sie dargestellt wurden, angegeben.

Tabelle 6.

1-Nitro-2-(d-1'-glucityl-amino)-benzol	Schmp.	157—158°	(k. Th.)
1,2-Dimethyl-4-nitro-5-(d-l'-glucityl-amino)-benzol	„	175—176°	„
9-d-Gluco-flavin	„	289—290°	(k. Th. Zers.)
Pentaacetyl-9-d-gluco-flavin . .	„	202°	„ „
3-Methyl-9-d-gluco-flavin . . .	„	264—266°	„ „
6,7-Dimethyl-9-d-gluco-flavin . .	„	273—274°	„ „
Pentaacetyl-6,7-dimethyl-9-d-gluco-flavin	„	240°	„ „
3,6,7-Trimethyl-9-d-gluco-flavin .	„	279—280°	„ „

Drehungsvermögen, Natriumlinie.
Spektroskop l = 1 dcm

	α_D^{19}	(c%)	$[\alpha]_D^{19}$	
9-d-Glucoflavin	—0,44	0,4908	—89,9	$n/_{10}$-NaOH
	$-0{,}22_3$	0,2454	—91	„
	$-0{,}10_3$	0,123	—82,5	„
	—0,13	0,2454	—54	$n/_{20}$-NaOH + $ges/_2$ Borax
6,7-Dimethyl-9-d-gluco-flavin	—0,26	0,4968	—52,4	$n/_{10}$-NaOH
	—0,17	0,2484	—68,5	„
	—0,10	0,1242	—80,5	„
	+0,15	0,2484	+60,5	$n/_{20}$-NaOH + $ges/_2$ Borax

Das 9-d-Glucoflavin läßt keine deutliche Abhängigkeit der Drehung von der Konzentration erkennen, auch schlägt nach Zusatz von Borsäure das Drehungsvermögen nicht um. Das 6,7-Dimethyl-9-d-glucoflavin zeigt den sonst beobachteten Umschlag der Drehung nach Zusatz von Borsäure, in n/10 Natronlauge nimmt aber im Gegensatz zu anderen Flavinen die Drehung mit fallender Konzentration zu.

Für die zur Herstellung der Flavine benötigten Zuckeramine war nur bisher das mit etwa 30% d. Th. verlaufende Verfahren von M. Roux[32]) bekannt. Man arbeitet dabei so, daß unter steter Neutralisation mit verd. Schwefelsäure und unter portionsweisem Eintragen von 3-proz. Natriumamalgam das Oxim in wässriger Lösung bei etwa 20—25° reduziert wird. Nachdem man nun nach genauer Neutralisation eingeengt hat, müssen Neben-

produkte der Reduktion (Pentite bzw. Hexite) durch Auskochen mit Alkohol entfernt werden. Man setzt dann das Amin mit gelöschtem Kalk in Freiheit und extrahiert es mit viel siedendem Alkohol. Es ist empfehlenswert, die Amine dann noch über ein gut krystallisierendes Salz zu reinigen.

Es wurde nun versucht, dieses unangenehme Reduktionsverfahren durch ein besseres zu ersetzen. Die katalytische Reduktion schien keine große Aussichten auf Erfolg zu haben, da aus der Literatur bekannt war, daß die katalytische Reduktion von Oximen stets von vielen Nebenreaktionen begleitet ist. Andererseits war aber auch gerade in letzter Zeit von O. Schales[33]) gezeigt worden, daß unter bestimmten Bedingungen eine befriedigende Ausbeute an primären Aminen zu erzielen ist. Das in Eisessig gelöste Oxim (substituierte Phenyl-acetaldehyd-oxime) wurde zu einer Suspension des Katalysators (Palladiumoxyd) in Eisessig-Schwefeläure zutropfen lassen. Die Ausbeute an primärem Amin betrug so 80—85%.

Diese Methode ließ sich jedoch nicht auf Zuckeroxime übertragen. Die berechnete Menge Wasserstoff wurde zwar aufgenommen, aber nach der Aufarbeitung (Zusatz der der Schwefelsäure äquivalenten Menge NaOH, Einengen im Vacuum, Zusatz von gelöschtem Kalk zu der wässrigen Lösung und Auskochen mit viel siedendem Alkohol) konnte kein Amin nachgewiesen werden. In Eisessig allein erhielt ich nach der Aufarbeitung etwa 65% mit n/10 Schwefelsäure titrierbare Base.

Es gelang mir nun durch folgendes Verfahren etwa 85% primäres Amin aus den Zuckeroximen zu gewinnen: Zu einer Suspension von reduziertem Platinoxyd in Wasser wurde in einer Tropfhydrierapparatur[33]) das in Wasser gelöste Oxim so langsam zutropfen lassen, daß die eingetropfte Menge schon vollständig reduziert war, bevor neues Oxim eintropfte. Nach dem Filtrieren vom Katalysator kann man etwa 95% Base mit n/10 Schwefelsäure titrieren, davon lassen sich aber durch Kochen der wässrigen Lösung 10% in Form von Ammoniak verjagen, die restlichen 85% kann man nach dem Einengen im Vacuum direkt der Kondensation mit o-Halogen- oder o-Di-nitrobenzolen unterwerfen. Man erhält so die für die Darstellung von Flavinen wichtigen Nitrobasen in denselben Ausbeuten und von demselben Reinheitsgrad wie aus den nach M. Roux dargestellten Aminen.

---

[33]) O. Schales B. *68*, 1943 (1935); dort auch ältere Literatur.

Beschreibung der Versuche.

9-Methyl-iso-alloxazin.

1,1 g N-Methyl-o-phenylendiamin wurden in 20 ccm Wasser durch Zusatz von 4 ccm konz. Salzsäure gelöst und mit 1,4 g Alloxan-mono-hydrat in 10 ccm Wasser versetzt. Das Reaktionsgemisch erhitzte ich 5 Min. zum Sieden. Die Abscheidung eines dunkelbraunen Produkts begann schon in der Hitze. Nach dem Erkalten wurde abgesaugt und 2-mal aus Eisessig umgelöst. Zur weiteren Reinigung wurde in verd. Natronlauge gelöst und 2-mal mit Chloroform ausgeschüttelt. Dann wurde mit Eisessig angesäuert und im Apparat erschöpfend mit Chloroform extrahiert. Dabei blieb ein gelber, grün-fluorescierender Farbstoff in der wässrigen Schicht. Das durch Chloroform extrahierte Hauptprodukt wurde nach Verdampfen des Lösungsmittels 2-mal aus 4-n. Essigsäure umkrystallisiert. Die in verschiedenen Versuchen erzielten Ausbeuten an reinem Farbstoff betrugen etwa 70% d. Th.

Zur Analyse wurde 3 Stdn. über Phosphorpentoxyd bei 100° unter 0,5 mm getrocknet.

4,091 mg Subst.: 8,73 mg CO_2, 1,27 mg H_2O.

1,839 mg Subst.: 0,394 ccm N (26°, 756 mm).

$C_{11}H_8N_4O_2$ (228,1) Ber. C 57,88%, H 3,53%, N 24,56%

Gef. C 58,19%, H 3,47%, N 24,33%

Eine Lösung von 2,76 mg Substanz in 100 ccm Chloroform (10% Alkohol enthaltend) zeigt im Stufenphotometer (C. Zeiß) bei 2,5 mm Schichtdicke eine Durchlässigkeit D = 53% (Farbfilter S 47). Daraus folgt für 0,100 mg Farbstoff in 1 ccm $\varepsilon = 4{,}0$, während der entsprechende Wert für Lumilactoflavin $\varepsilon = 4{,}30$ beträgt. Unter Berücksichtigung der verschiedenen Molekulargewichte würde bei gleicher molarer Farbstärke $\varepsilon = 4{,}83$ betragen. Die Differenz von 17% entspricht der etwas geringeren Höhe der langwelligsten Absorptionsbanden in Abbild. 1 gegenüber denjenigen von Lumilactoflavin.

9-Methyl-iso-alloxazin gibt ein rotes, schwer lösliches Silbersalz. Sein Geschmack ist wie derjenige des Lumilactoflavins bitter.

Alkalische Hydrolyse des 9-Methyl-iso-alloxazins[34]).

54,8 mg Substanz wurden mit 50 ccm n/10-Barytwasser 1 Stde. auf dem siedenden Wasserbade erhitzt. Die noch etwas gelbe Lösung neutralisierte ich genau mit n/10-Schwefelsäure und verdampfte nach Entfernung des Bariumsulfates zur Trockne. Der Rückstand wurde in 10 ccm 2-n. Essigsäure aufgenommen und 7-mal mit Chloroform, hierauf 2-mal mit Aether durchgeschüttelt.

Die essigsaure Lösung versetzte ich mit 12 ccm Eisessig und dann mit 40 ccm einer 5-proz. Lösung von Xanthydrol in Methylalkohol. Es krystallisierten 24,2 mg Dixanthyl-harnstoff vom richtigen Schmp. und Misch-Schmp. 277° (korr.). Berechnet waren 31 mg. Die Ausbeute entspricht derjenigen, die aus Lactoflavin unter gleichen Bedingungen erhalten wurde.

Die vereinigten Chloroform- und Aetherauszüge wurden zur Trockne verdampft und der Rückstand aus Wasser umkrystallisiert. Dabei fiel fast alle Substanz in schönen, blaßgelben Nadeln vom Schmp. 174° aus, die sich durch den Mischschmelzpunkt und alle sonstigen Eigenschaften als identisch mit der α-Methyl-β-keto-α, β-dihydro-chinoxalin-γ-carbonsäure von O. Kühling und O. Kaselitz erwiesen. (III)

3,9-Dimethyl-iso-alloxazin.

1,1 g N-Methyl-o-phenylendiamin wurden in 10 ccm 2-n. Salzsäure gelöst, mit 2,5 g der Natriumbisulfitverbindung des Methyl-alloxans (aus Theobromin) versetzt und 2 Min. zum Sieden erhitzt. Das 3,9-Dimethyl-flavin begann schon in der Hitze in langen, orangegelben Nadeln auszufallen. (1,3 g). Schmp. 320—325° (unter Zersetzung). Zur Analyse wurde aus 40% Essigsäure umkrystallisiert und bei 100° und 0,5 mm getrocknet.

4,306 mg Sbst.: 9,42 mg CO_2, 1,61 mg H_2O.
1,739 mg Sbst.: 0,364 ccm N (755 mm, 25°).
4,679 mg Sbst.: 8,94 mg AgJ.

$C_{12}H_{10}N_4O_2$.

Ber. C 59,48%, H 4,16%, N 23,14%, (N)CH_3 12,39%
Gef. C 59,67%, H 4,18%, N 23,10%, (N)CH_3 12,23%

Die Substanz gibt kein Silbersalz und läßt sich aus Chloroform durch verd. Alkali nicht ausschütteln. Sie besitzt bitteren Geschmack.

---

[34]) vergl. O. Warburg u. W. Christian, Biochem. Ztschr. *258*, 496, *263*, 228 (1933); R. Kuhn u. Th. Wagner-Jauregg, B. *66*, 1577 (1933).

Lumilactoflavin (6,7,9-Trimethyl-iso-alloxazin).

0,5 g Chlorhydrat des 1,2-Dimethyl-4-amino-5-methyl-aminobenzols wurden mit 0,5 g Alloxan-tetrahydrat in 20 ccm Wasser 3 Min. zum Sieden erhitzt. Nach dem Erkalten wurde das ausgefallene Lumilactoflavin (80% d. Th.) abgesaugt und aus 50% Essigsäure umkrystallisiert.

3,713 mg Sbst.: 8,235 mg CO_2, 1,52 mg H_2O.

2,210 mg Sbst.: 0,426 ccm N (752 mm, 25°).

$C_{13}H_{12}N_4O_2$ (256,1) Ber. C 60,91%, H 4,72%, N 21,86%
Gef. C 60,49%, H 4,58%, N 21,84%

Der korr. Schmp. lag bei 330° (unt. Zers.) Die Hydrolyse zur Oxocarbonsäure wurde nach der für den Abbau des Naturfarbstoffs gegebenen Vorschrift vorgenommen[35]).

6,7-Dimethyl-9-n-amyl-flavin.

1,6 g 1,2-Dimethyl-4-nitro-5-amino-benzol und 1,9 g n-Amyljodid wurden 5 Stdn. im Rohr auf 140° erhitzt. Das Reaktionsprodukt wurde mit Zinnchlorür in mit Chlorwasserstoff gesättigtem Eisessig reduziert. Nach Zusatz von überschüssiger Natronlauge nahm ich das gebildete 1,2-Dimethyl-4-amino-5-(n-amylamino)-benzol in Aether auf, trocknete mit Natriumsulfat und verdampfte zur Trockne. Das zurückbleibende Diamin wurde in Eisessig gelöst, mit überschüssigem Alloxan versetzt und einige Minuten zum Sieden erhitzt. Das reichlich entstandene Flavin wurde nach Verdünnen mit Wasser durch Chloroform vollkommen ausgeschüttelt, das Chloroform getrocknet und verdampft. Zur Reinigung wurde der rohe Farbstoff mit Aluminiumoxyd verrieben und das Gemisch in den oberen Teil eines mit Aluminiumoxyd beschickten Chromatogrammrohres gestampft. Zur Entwicklung des „Chromatogramms" diente ein Gemisch von Xylol und Methanol. Nebenprodukte der Synthese ließen sich so schnell auswaschen, während das Flavin aus der oberen Zone des Rohres nur langsam abwärts wanderte.

Zur Analyse wurde aus verd. Essigsäure umkrystallisiert, wobei orangefarbige, schmale Stäbchen erhalten wurden, die sich bei 295—300° (korr.) unter Dunkelfärbung zersetzten.

(4 Stdn. bei 100° unter 0,5 mm über P_2O_5 getrocknet).

4,068 mg Sbst.: 9,735 mg CO_2, 2,36 mg H_2O.

2,27 mg Sbst.: 0,350 ccm (720 mm, 19°).

$C_{17}H_{20}N_4O_2$ (312,2) Ber. C 65,35%, H 6,45%, N 17,95%
Gef. C 65,27%, H 6,49%, N 18,02%

---

[35]) R. Kuhn und H. Rudy B. *67*, 892 (1934).

Im Gegensatz zu Lumilactoflavin geht die Substanz auch aus verd. Natronlauge teilweise in Chloroform; sie besitzt ferner kaum bitteren Geschmack, was mit der geringen Löslichkeit zusammen hängen dürfte. Das licht-elektrisch gemessene Absorptionsspektrum stimmt nach Lage und Höhe der Banden mit demjenigen des Lactoflavins überein.

1,2-Dimethyl-4-nitro-5-(l-arabityl-1'-amino)-benzol.

40 g krystallisiertes l-Arabinamin[32]) und 40 g 1,2-Dimethyl-4,5-dinitro-benzol (Schmp. 40—50°)[36]) wurden in 100 ccm 80-proz. Aethylalkohol 6 Stdn. auf 135° erhitzt. Nach dem Verdampfen des Lösungsmittels wurde unverändertes Dinitroxylol dem roten, öligen Rückstand mit Aether entzogen und dieser aus viel Wasser, dann aus wenig Eisessig umkrystallisiert. Ausbeute an reiner Substanz 16,5 g, Schmp. 216° (k. Th.). Zur Analyse wurde 2 Stdn. bei 100° unter 0,5 mm über Phosphorpentoxyd getrocknet.

4,212 mg Sbst.: 8,03 mg CO_2, 2,60 mg H_2O.
3,435 mg Sbst.: 0,279 ccm N (19°, 761 mm).
$C_{13}H_{20}O_6N_2$ Ber. C 51,97%, H 6,71%, N 9,33%
Gef. C 52,00%, H 6,91%, N 9,51%

$$[\alpha]_D^{20} = (-0{,}01^\circ \times 100) : (0{,}944 \times 1) = -1^\circ \pm 1^\circ$$

Aus warmem Eisessig, worin sich die Substanz leicht löst, krystallisiert das 1,2-Dimethyl-4-nitro-5-(l-arabityl-1'-amino)-benzol in vielfach büschelig angeordneten, glänzenden, orangegelben, dünnen Stäbchen, deren Absorptionsspektrum (Abb. 3) mit demjenigen des roten 1,2-Dimethyl-4-nitro-5-methylamino-benzols[37]) nach Lage und Höhe der Banden genau übereinstimmt. In Aether und in Chloroform ist die Substanz unlöslich, in wässrigem Alkohol löst sie sich beträchtlich.

6,7-Dimethyl-9-l-arabo-flavin.

Je 1,0 g 1,2-Dimethyl-4-nitro-5-(l-arabityl-1'-amino)-benzol wurden in 10 ccm Wasser und 30 ccm conc. Salzsäure gelöst, mit fein gepulvertem Alloxan (Ueberschuß) und Zinnchlorür versetzt und kurz aufgekocht. Vorübergehend wurde die Lösung ganz

[36]) Durch Nitrieren von o-Xylol nach E. Noelting und Thesmar B. *35* 631 (1902), gewonnen. Das im Präparat in erheblicher Menge noch enthaltene 1,2-Dimethyl-4,6-dinitro-benzol tritt nicht in Reaktion. Bei späteren Versuchen wurde reines 1,2-Dimethyl-4,5-dinitro-benzol verwendet (Schmp. 115—116°).

[37]) R. Kuhn und K. Reinemund B. *67*, 1932 (1934).

farblos, nahm aber bald wieder intensiv gelbe Farbe an. Nach Verdünnen mit 300 ccm Wasser wurde unter Eiskühlung durch 1-proz. $KMnO_4$-Lösung das überschüssige Reduktionsmittel entfernt. Hierauf adsorbierte ich nach der für die Isolierung natürlicher Flavine bekannten Vorschrift an Frankonit SB und eluierte 3-mal mit Pyridin Gemisch. Durch Verdampfen der Elutionen erhielt ich das freie 6,7-Dimethyl-9-l-araboflavin. Krystallisiert wurde aus verd. Essigsäure, getrocknet 2 Stdn. bei 100° (0,5 mm, P_2O_5). Schmp. 294—295° (Zersetzung, Aufschäumen). Das für die Tierversuche verwendete Präparat gab bei der Analyse:

4,315 mg Sbst.: 8,48 mg CO_2, 2,07 mg H_2O.

3,134 mg Sbst.: 0, 410 N (19°, 734 mm).

$C_{17}H_{20}N_4O_6$ (376,2) Ber. C 54,23%, H 5,36%, N 14,88%
Gef. C 53,60%, H 5,37%, N 14,77%

$[\alpha]_D^{21.5} = (-0{,}175° \times 100) : (0{,}2176 \times 1) = -80{,}4° \pm 10°$
in n/10 NaOH

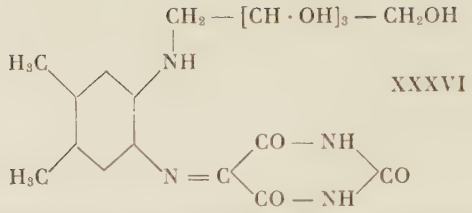
$[\alpha]_D^{21.5} = (+0{,}40° \times 100) : (0{,}1088 \times 1) = +367° \pm 10°$
n/20 NaOH + ges/2 Borax

$[\alpha]_{Cd}^{21.5} = (+0{,}24° \times 100) : (0{,}1088 \times 1) = +220° \pm 10°$
n/20 NaOH + ges/2 Borax

Für den Vergleich der alkalischen Photolyse (Abb. 2) wurden je 40 ccm 0,5-n Natronlauge, die je 65 γ $C_{17}H_{20}N_4O_2$ in 1 ccm enthielten, aus etwa 30 ccm Entfernung mit einer 500 Watt-Lampe genau gleichartig bestrahlt. Nach den angegebenen Zeiten wurden je 2 ccm mit der Pipette entnommen und zu 0,30 ccm Eisessig gegeben. Nach Verdünnen mit Wasser wurde erschöpfend mit Chloroform ausgeschüttelt, mit Chloroform auf 10 ccm aufgefüllt und der Farbstoffgehalt (γ $C_{13}H_{12}N_4O_2$ in 10 ccm Chloroform) am Stufenphotometer bestimmt. Die Endwerte der beiden Bestimmungen entsprechen etwa 65% der theoretisch möglichen Lumiflavinmenge.

1,2-Dimethyl-4-(alloxanyl-amino)-5-(l-arabityl-1'-amino)-benzol (XXXVI).

100 mg 1,2-Dimethyl-4-nitro-5-(l-arabityl-1'-amino)-benzol wurden in 25 ccm absolutem Alkohol+5 ccm Wasser mit 30 mg Platinoxyd und Wasserstoff geschüttelt bis 3 Mole H_2 aufgenommen waren und Entfärbung eintrat (15 Min.). Das farblose Filtrat erhitzte ich mit 80 mg Alloxan in 10 ccm Wasser+10 ccm Eisessig 3 Min. zum Sieden. Hierauf wurde im Vacuum fast zur Trockne eingeengt und in siedendem Wasser aufgenommen. Beim Erkalten fiel die aus dem Diamin und Alloxan unter Austritt von



XXXVI

nur 1 Mol Wasser entstandene Substanz in citronengelben, büschelig vereinigten Nadeln (50 mg) aus, die nach wiederholter Krystallisation aus Wasser bei 216° (Zers.; k. Th.) schmolzen. Zur Analyse wurde 2 Stdn. bei 3 mm und 100° über P_2O_5 getrocknet.

4,041 mg Sbst.: 7,61 mg CO_2, 1,93 mg H_2O.

3,493 mg Sbst.: 0,426 ccm N (21°, 759 mm).

$C_{17}H_{22}N_4O_7$ (394,2). Ber. C 51,75%, H 5,62%, N 14,21%
Gef. C 51,36%, H 5,35%, N 14,14%

In den wässrigen Mutterlaugen findet sich das nebenbei entstandene 6,7-Dimethyl-9-l-araboflavin.

Arabinamin-Oxalate.

Die folgenden Präparate sind in Anlehnung an die Vorschrift von M. Roux[32]) durch Reduktion von d- und l-Arabinose-oxim gewonnen worden.

d-Arabinaminoxalat krystallisiert aus wässrigem Alkohol (1:1) in gerade abgeschnittenen, vielfach zu Rosetten vereinigten, derben Prismen (Auslöschung 0°), die bei 190—191° (k. Th.) schmelzen.

4,496 mg Sbst.: 6,03 mg CO_2, 2,90 mg H_2O.

4,868 mg Sbst.: 0,297 ccm N (22°, 749 mm).

$C_{12}H_{28}N_2O_{12}$ (392,2) Ber. C 36,71%, H 7,19%, N 7,14%
Gef. C 36,58%, H 7,21%, N 6,96%

Für das l-Arabinaminooxalat, das bereits bekannt war, fand ich den Schmelzpunkt ebenfalls bei 190—191° (k. Th.)

Rac. Arabinaminoxalat.

Zur Darstellung wurden je 50 mg der beiden Antipoden in heißem, wässrigem Alkohol (1:1) gelöst. Beim Erkalten schieden sich rosettenförmig angeordnete, dünne Stäbchen ab, die bei 164 bis 165° (k. Th.) schmolzen.

Zur Analyse wurde bei 100° (0,5 mm, P_2O_5) getrocknet. —

4,232 mg Sbst.: 5,65 mg CO_2, 2,755 mg H_2O.

4,483 mg Sbst.: 0,274 ccm N (22°, 749 mm).

$C_{12}H_{28}O_{12}N_2$ Ber. C 36,71%, H 7,19%, N 7,14%
Gef. C 36,41%, H 7,28%, N 6,97%

1-Nitro-2-(d-1'-arabityl-amino)-benzol.

10 g d-Arabinamin (2 Mole), gelöst in 30 ccm 80-proz. wässrigem Aethylalkohol, wurden mit 5,6 g o-Dinitrobenzol[38]) (1 Mol) 6 Stdn. auf 135° erhitzt. Nach dem Erkalten war das gesuchte orangerote Kondensationsprodukt auskrystallisiert. Unverändertes o-Dinitrobenzol und Alkohol wurden mit Wasserdampf abgetrieben, worauf die Substanz in 230 ccm siedendem Wasser gelöst war. Sie fiel beim Erkalten schön aus und wurde aus 50 ccm Eisessig umkrystallisiert. Nach dem Trocknen lagen 5,6 g vom Schmp. 187—188° (k. Th.) vor. Die Mutterlaugen lieferten noch 0,3 g reine Substanz. Die Ausbeute von 5,9 g entspricht 61,1% d. Th. Durch weitere Krystallisationen änderte sich der Schmelzpunkt nicht mehr. Die Substanz ist kaum löslich in Aether, nur wenig in Wasser, besser in wässrigem Alkohol. Aus Eisessig krystallisiert sie in glänzenden, orangefarbigen Prismen.

Zur Analyse wurde bei 100° (0,5 mm, P_2O_5) getrocknet. —
4,136 mg Sbst.: 7,35 mg CO_2, 2,18 mg H_2O.
3,457 mg Sbst.: 0,316 ccm N (25°, 752 mm).

$C_{11}H_{16}N_2O_6$ (272,1) Ber. C 48,50%, H 5,92%, N 10,30%
Gef. C 48,47%, H 5,90%, N 10,36%

1-Nitro-2-(d-1'-tetraacetyl-arabityl-amino)-benzol.

200 mg 1-Nitro-2-(d-1'-arabityl-amino)-benzol wurden in 10 ccm Pyridin und 10 ccm Essigsäureanhydrid gelöst und 2 Min. zum Sieden erhitzt. Nach dem Erkalten wurde mit 100 ccm Chloroform verdünnt, in Eiswasser gegossen und 2-n Salzsäure zugefügt, bis nach dem Umschütteln die Flüssigkeit eben sauer (Kongo) reagierte. Das Chloroform wurde abgelassen und die wässrige Schicht nochmals mit 50 ccm Chloroform durchgeschüttelt, wobei sie ganz farblos wurde. Die vereinigten Chloroformauszüge wurden 3-mal mit 500 ccm Wasser durchgeschüttelt und über Natriumsulfat getrocknet. Das beim Verdampfen in fast berechneter Menge auskrystallisierende Acetylprodukt wurde zur Analyse aus abs. Alkohol umgelöst, wobei es in orangegelben, an den Enden abgeschrägten, kleinen Säulen vom Schmp. 126 bis 127° (k. Th.) erhalten wurde.

---

[38]) E. Bamberger und R. Hübener, B. *36*, 3803 (1903).

4,250 mg Sbst.: 8,06 mg CO_2, 2,13 mg H_2O.
4,106 mg Sbst.: 0,231 ccm N (23° 751 mm).
$C_{19}H_{24}N_2O_{10}$ (440,2) Ber. C 51,80%, H 5,49%, N 6,36%
Gef. C 51,72%, H 5,61%, N 6,41%

1-Nitro-2-(l-1'-arabityl-amino)-benzol.

Aus 5,6 g o-Dinitrobenzol und 10 g l-Arabinamin unter denselben Bedingungen und in derselben Ausbeute (6,0 g = 66% d. Th.) wie die d-Verbindung erhalten. Schmp. 187—188° (k. Th.)

Zur Analyse wurde bei 100° (0,5 mm, P_2O_5) getrocknet. —
4,244 mg Sbst.: 7,57 mg CO_2, 2,25 mg H_2O.
3,760 mg Sbst.: 0,343 ccm N (22°, 749 mm).
$C_{11}H_{16}N_2O_6$ (272,2) Ber. C 48,50%, H 5,92%, N 10,30%
Gef. C 48,65%, H 5,93%, N 10,40%

Die rac. (d,l)-Verbindung stellte ich durch Lösen von je 20.0 mg der Antipoden in heißem Eisessig her. Beim Erkalten fielen orangegelbe, flache Prismen aus, die gerade abgeschnitten waren oder dachförmig endigten und schiefe Auslöschung zeigten. Schmp. 168—169° (k. Th.).

1-Nitro-2-(l-1'tetraacetyl-arabityl-amino)-benzol.

Durch Acetylierung von 1-Nitro-2-(l-1'-amino)-benzol mit Essigsäureanhydrid und Pyridin entsprechend der d-Verbindung dargestellt. Orangegelbe Prismen aus Alkohol vom Schmp. 126 bis 127° (k. Th.).

4,368 mg Sbst.: 8,29 mg CO_2, 2,00 mg H_2O.
4,469 mg Sbst.: 0,252 ccm N (23°, 751 mm).
$C_{19}H_{24}N_2O_{10}$ (440,2) Ber. C 51,80%, H 5,49%, N 6,36%
Gef. C 51,60%, H 5,12%, N 6,43%

Die rac. (d,l)-Tetraacetylverbindung krystallisiert aus absolutem Alkohol in orangefarbigen, an den Enden abgeschrägten, kleinen Säulen, die schief auslöschen. Der Schmp. (146—147° k. Th.) liegt 20° höher als derjenige der Komponenten.

9-d-Araboflavin.

1,50 g 1-Nitro-2-(d-1'-arabityl-amino)-benzol wurden fein zerrieben, mit 150 ccm 80% wässrigem Aethylalkohol übergossen und mit 300 mg Palladiumoxyd und Wasserstoff geschüttelt. Nach 40 Min. waren 3,0 Mole H_2 aufgenommen und die Lösung farblos. Nach Abtrennung des Katalysators wurde, ohne Durchsaugen von Luft, im Vacuum auf etwa 20 ccm eingeengt und in eine auf

80° erhitzte, konzentrierte, salzsaure Lösung von Alloxan einlaufen lassen. Die Flüssigkeit, die sich sofort braungelb färbte, wurde kurz aufgekocht. Beim Erkalten krystallisierten 1,21 g = 63,3% d. Th. 9-d-Araboflavin aus. Zur Analyse wurde aus viel siedendem Wasser umkrystallisiert, wobei die Farbstoffausbeute auf 0,74 g (38,7% d. Th.) zurückging und der Schmelzpunkt den konstanten Wert von 296° (k. Th.), Dunkelfärbung und Aufschäumen) erreichte.

Getrocknet wurde 2 Stdn. über Phosphorpentoxyd bei 100° unter 0,5 mm.

4,286 mg Sbst.: 8,07 mg CO_2, 1,83 mg H_2O.

2,860 mg Sbst.: 0,409 ccm N (23°, 742 mm).

$C_{15}H_{16}N_4O_6$ (348,1) Ber. C 51,71%, H 4,62%, N 16,09%

Gef. C 51,35%, H 4,78%, N 16,10%

Das 9-d-Araboflavin krystallisiert aus verd. Essigsäure in kugeligen Aggregaten schön ausgebildeter Nadeln, die den meist beobachteten Krystallisationen des Lactoflawins zum Verwechseln ähnlich sehen. Im Schmelzpunkt besteht gegenüber Lactoflavin 293° (k. Th.) ein Unterschied von nur etwa 3°, doch zeigte das Gemisch deutliche Depression (283—284° k. Th.). Die Farbe des 9-Araboflavins (chromgelb) ist heller als die des Lactoflavins (orangegelb) entsprechend dem Mindergehalt der 6,7-ständigen Methylgruppen. Als Homologe des 9-Methyl-iso-alloxazins zeigen die 9-Arabityl-iso-alloxazine das langwellige Hauptmaximum der Absorption bei 440 mμ, während es bei den in 6,7-Stellung dimethylierten Farbstoffen bei 445 mμ liegt. In Uebereinstimmung damit ist auch die Farbe des Fluorescenzlichtes in Lösung beim Vergleich mit Lactoflavin und Lumilactoflavin etwas blaustichiger grün.

Tetraacetyl-9-d-arabo-flavin.

Die Acetylierung wurde mit Essigsäureanhydrid und Pyridin nach der für das Lactoflavin gegebenen Vorschrift ausgeführt und lieferte die Tetraacetyl-Verbindung in nahezu berechneter Ausbeute. Die Substanz krystallisiert aus viel Wasser in gelben, gedrungenen Säulen, die gerade abgeschnitten sind und etwas schief auslöschen. Schmp. 265—266° (k. Th.)

4,196 mg Sbst.: 8,200 mg CO_2, 1,79 mg H_2O.

3,198 mg Sbst.: 0,310 ccm N (22°, 751 mm).

$C_{23}H_{24}N_4O_{10}$ (516,2) Ber. C 53,47%, H 4,68%, N 10,85%

Gef. C 53,30%, H 4,77%, N 11,08%

Die wässrige Lösung gibt an Chloroform allen Farbstoff ab. Auch die sonstigen Löslichkeitsverhältnisse und die leichte

Verseifbarkeit durch verd. Alkali in der Kälte erinnern an Tetraacetyl-lactoflavin.

9-l-Arabo-flavin.

1,50 g 1-Nitro-2-(l-1'-arabityl-amino)-benzol wurden, wie bei der d-Verbindung beschrieben, katalytisch hydriert und mit Alloxan kondensiert. Das beim Erkalten ausfallende Flavin (65% d. Th.) wurde zur Analyse aus verd. Essigsäure umkrystallisiert und über Phosphorpentoxyd bei 100° und 0,5 mm getrocknet.

4,325 mg Sbst.: 7,97 mg CO_2, 1,85 mg H_2O.

2,946 mg Sbst.: 0,422 ccm N (23°, 744 mm).

$C_{15}H_{16}N_4O_6$ (348,1) Ber. C 51,71%, H 4,62%, N 16,09%
Gef. C 51,43%, H 4,79%, N 16,17%

Die Substanz krystallisiert, wie ihr Antipode, aus viel Wasser in kugeligen Aggregaten schöner chromgelber Nadeln, die bei 296° (k. Th.) unter Dunkelfärbung und Aufschäumen schmelzen. Mischt man gleiche Teile d- und l-Araboflavin, so ändert sich der Schmelzpunkt nicht (296°, k. Th.)

Tetraacetyl-9-l-araboflavin.

Die Darstellung erfolgte wie beim Spiegelbild und lieferte in gleicher Weise und Ausbeute die l-Acetylverbindung, die sich aus viel heißem Wasser in gelben, gedrungenen Säulen vom Schmp. 265—266° (k. Th.) abschied.

Zur Analyse wurde bei 100° (0,5 mm, P_2O_5) getrocknet.

4,357 mg Sbst.: 8,54 mg CO_2, 1,86 mg H_2O.

3,168 mg Sbst.: 0,307 ccm N (22°, 751 mm).

$C_{23}H_{24}N_4O_{10}$ (516,2) Ber. C 53,47%, H 4,68%, N 10,85%
Gef. C 53,43%, H 4,78%, N 11,08%

Ein Gemisch gleicher Teile von d- und l-Tetraacetyl-9-araboflavin schmilzt höher als die einzelnen Komponenten, nämlich bei 273—274° (k. Th.) Ich habe das Racemat auch durch Lösen von je 50 mg d- und l-Verbindung in heißer verd. Essigsäure dargestellt. Die beim Erkalten ausfallenden, gelben Säulchen schmolzen ebenfalls bei 273—274° (k. Th.). — Mit Tetraacetyl-lactoflavin 1:1 wurde keine Schmelzpunktsdepression beobachtet. (geprüft: aktive und racem. Verbindungen).

1,2-Dimethyl-4-nitro-5-(d-arabityl-1'-amino)-benzol.

1,00 g 1,2-Dimethyl-4,5-dinitro-benzol und 2 g d-Arabinamin wurden in 5 ccm 80% wässrigem Aethylalkohol 6 Stdn. auf 135° erhitzt. Nach dem Erkalten wurde das in orangeroten Krystallen auskrystallisierte Kondensationsprodukt im Vacuum vom Lö-

sungsmittel befreit und aus Eisessig umgelöst. Ausbeute 1,36 g vom Schmp. 213—214° (k. Th.).

Zur Analyse wurde bei 100° unter 0,5 mm 2 Stdn. getrocknet.

4,231 mg Sbst.: 8,10 mg CO_2, 2,545 mg H_2O.

3,222 mg Sbst.: 0,261 ccm N (20°, 749 mm).

$C_{13}H_{20}N_2O_6$ (300,1) Ber. C 51,97%, H 6,71%, N 9,33%
Gef. C 52,21%, H 6,73%, N 9,30%

d,l-Verbindung: 150 mg Substanz wurden mit 150 mg des weiter oben beschriebenen Antipoden in heißem Eisessig gelöst. Beim Erkalten fiel das d,l-1,2-Dimethyl-4-nitro-5-(arabityl-1'-amino)-benzol in orangefarbenen flachen, kurzen Prismen aus, deren Auslöschung etwa 45° betrug und die bei 203—204° (k. Th.) schmolzen.

Die d-Tetraacetylverbindung wurde mit Essigsäureanhydrid in Pyridin dargestellt und aus abs. Alkohol umkrystallisiert. Chromgelbe Stäbchen vom Schmp. 113—114° (k. Th.)

4,434 mg Sbst.: 8,80 mg CO_2, 2,47 mg H_2O.

3,396 mg Sbst.: 0,185 ccm N (21°, 750 mm). Getrocknet unter 0,5 mm bei 100°.

$C_{21}H_{28}N_2O_{10}$ (468,2) Ber. C 53,82%, H 6,03%, N 5,98%
Gef. C 54,13%, H 6,26%, N 6,24%

Die l-Tetraacetylverbindung, in gleicher Weise durch Acetylieren des Spiegelbildes gewonnen, krystallisiert aus abs. Alkohol in chromgelben Stäbchen, die gleichfalls bei 113—114° (k. Th.) schmelzen.

4,234 mg Sbst.: 8,39 mg CO_2, 2,27 mg H_2O.

4,042 mg Sbst.: 0,217 ccm N (21°, 755 mm). — Getrocknet unter 0,5 mm bei 100°.

$C_{21}H_{28}N_2O_{10}$ Ber. C 53,82%, H 6,03%, N 5,98%
Gef. C 54,04%, H 6,00%, N 6,19%

Das rac. 1,2-Dimethyl-4-nitro-5-tetraacetyl-arabityl-(1'-amino)-benzol stellte ich durch Lösen von je 50 mg der optischen Antipoden in heißem abs. Alkohol dar. Beim Erkalten schied sich die d,l-Verbindung in kleinen, abgeschrägten, orange-stichig-gelben Säulen ab, die kreuzförmig verwachsen waren (Zwillinge) und erst bei 143—144° (k. Th.) schmolzen.

6,7-Dimethyl-9-d-arabo-flavin.

1 g 1,2-Dimethyl-4-nitro-5-(d-arabityl-1'-amino)-benzol und 1 g Borsäure wurden mit 60 ccm Eisessig kurz zum Sieden erhitzt, wobei alles in Lösung ging. Nach dem Abkühlen wurde unter Kühlung mit Zinkstaub geschüttelt, wobei nach 30 sec. Entfärbung eintrat. Nun wurde sofort vom Zinkstaub abgenutscht und

dieser mit 30 ccm Eisessig gewaschen. Inzwischen war eine 30° warme Lösung von 1 g Alloxan und 1 g Borsäure in 30 ccm Eisessig bereitet worden. Die Lösung des Diamins wurde nun unter Rühren zu der Alloxan-Lösung gegeben, wobei die Kondensation sofort einsetzte. Alsbald begann auch die Krystallisation des 6,7-Dimethyl-9-d-araboflavins. Nach 1/2 Stunde wurde im Vacuum zur Trockne gebracht und der Rückstand mit 50 ccm Wasser gewaschen. Zur weiteren Reinigung wurde das Flavin 2-mal in verd. Natronlauge gelöst und mit verd. Essigsäure wieder angesäuert. Beim Konzentrieren im Vacuum krystallisierte das Flavin in orangegelben Nädelchen. Dann wurde noch 1-mal aus verd. Essigsäure umkrystallisiert. Ausbeute 650 mg=52% d. Th. Das in den Mutterlaugen noch gelöste Flavin ist dabei nicht berücksichtigt. Schmp. 302—303° (k. Th. unkorr.) unter Dunkelfärbung und schwachem Schäumen.

Die Wiederholung des Versuches (Abänderung: katalytische Hydrierung der Nitrogruppe) lieferte 1,18 g Farbstoff (95% d. Th.)

Zur Analyse wurde bei 100° und 0,01 mm getrocknet. —

3,976 mg Sbst.: 7,88 mg CO_2, 1,91 mg H_2O.

3,023 mg Sbst.: 0,398 ccm N (24°, 754 mm).

$C_{17}H_{20}N_4O_6$ (376,2) Ber. C 54,23%, H 5,36%, N 14,88%
Gef. C 54,05%, H 5,38%, N 15,01%

Die in üblicher Weise gewonnene Tetraacetylverbindung krystallisiert aus Essigester in gelben, großen, flachen Prismen, die fast gerade auslöschen und bei 221—222° (k. Th.) schmelzen.

3,321 mg Sbst.: 0,303 ccm N (24°, 752 mm).

$C_{25}H_{28}N_4O_{10}$ (544,3) Ber. N. 10,30%. Gef. N 10,37%.

Das 6,7-Dimethyl-9-d-araboflavin schmeckt wie die l-Verbindung stark bitter.

6,7-Dimethyl-9-l-araboflavin.

Der nach dem Borsäure-Verfahren erhaltene Farbstoff (Ausbeute 95% d. Th.) schmilzt bei 302—303° (k. Th.) unter Dunkelfärbung und schwachem Schäumen.

Zur Analyse wurde bei 100° unter 0,01 mm getrocknet. —

4,382 mg Sbst.: 8,70 mg CO_2, 2,22 mg H_2O.

3,203 mg Sbst.: 0,418 ccm N (23°, 754 mm).

$C_{17}H_{20}N_4O_6$ (376,2) Ber. C 54,23%, H 5,36%, N 14,88%
Gef. C 54,15%, H 5,67%, N 14,93%

Ein Gemisch gleicher Teile d- und l-6,7-Dimethyl-9-araboflavin schmolz bei 295—296° (k. Th.)

Die Tetraacetylverbindung des 6,7-Dimethyl-9-l-araboflavins krystallisiert aus Essigester wie der Antipode in gelben, flachen Prismen vom Schmp. 221—222° (k. Th.)

3,623 mg Sbst.: 0,331 ccm N (24°, 752 mm).
$C_{25}H_{28}N_4O_{10}$ (544,3) Ber. N 10,30%. Gef. N 10,39%.

Die d,l-Verbindung wurde durch Lösen von je 20 mg des d- und des l-Tetraacetyl-6,7-dimethyl-9-araboflavins in Essigester bereitet, aus dem sich gelbe, schief auslöschende Stäbchen abschieden, die vielfach fächerförmig angeordnet waren und bei 283 bis 284° (k. Th.) schmolzen.

9-Phenyl-flavin.

0,200 g o-Amino-diphenylamin wurden in 5 ccm Eisessig gelöst und unter Rühren bei 15—20° in eine erkaltete Lösung von 0,300 g Alloxan-tetrahydrat und 0,500 g Borsäure in 30 ccm Eisessig eingetragen. Die Bildung des Flavins, erkennbar an der gelbgrünen Fluorescenz, setzte sofort ein. Nach 1/2 Stde. wurde mit Wasser verdünnt, um die Abscheidung des Farbstoffes, die schon in der Eisessiglösung begonnen hatte, zu vervollständigen. Nach Stehen über Nacht wurde abgesaugt und 1-mal aus Eisessig umkrystallisiert, worauf die Substanz analysenrein war. Ausbeute: 0,200 g = 63% d. Th.

4,118 mg Sbst.: 10,00 mg CO_2, 1,30 mg H_2O. —
2,235 mg Sbst.: 0,383 ccm N (21°, 748 mm). — Getrocknet unter 0,5 mm bei 100°.
$C_{16}H_{10}N_4O_2$ (290,1) Ber. C 66,18%, H 3,47%, N 19,31%
Gef. C 66,23%, H 3,53%, N 19,58%

Das 9-Phenyl-flavin krystallisiert aus Eisessig in orangegelben, kurzen, dicken Prismen, die mitunter dachförmig endigen und annähernd gerade Auslöschung zeigen. Die Substanz ist im Gegensatz zu anderen Flavinen geschmacklos, was auf der äußerst geringen Löslichkeit in Wasser beruhen könnte. Selbst siedendes Wasser wird nur äußerst schwach angefärbt. Gibt man etwas 2-n Natronlauge zu, so geht alles mit gelber Farbe in Lösung (stark tingierend, ohne Fluorescenz). Säuert man mit einigen Tropfen Eisessig an, so tritt sehr lebhafte grüne Fluorescenz auf, und aus einer solchen Lösung läßt sich der Farbstoff schon bei einmaligem Durchschütteln quantitativ in Chloroform treiben. In siedendem Pyridin, weniger gut in siedendem Amylalkohol ist das 9-Phenylflavin löslich. Die amylalkoholische Lösung gibt beim Durchschütteln mit Wasser viel Farbstoff an dieses ab. Im Schmelzpunktsröhrchen erhitzt, läßt das 9-Phenylflavin bis 370° keinen Schmelz- bzw. Zersetzungspunkt erkennen.

Absorptionsspektrum. Die licht-elektrische Photometrie führt übereinstimmend mit der Betrachtung mit unbewaffneten Auge zu der bemerkenswerten Feststellung, daß die in

9-Stellung befindliche Phenylgruppe keine Farbvertiefung gegenüber einer Methylgruppe bewirkt. Das Absorptionsspektrum des 9-Phenyl-iso-alloxazins ist demjenigen des 9-Methyl-iso-alloxazins in der Struktur und Lage der Banden ganz außerordentlich ähnlich; das langwellige Hauptmaximum (437 mμ gegenüber 440 mμ ist nur eine Spur kurzwelliger. Wie aus den Formelbildern ersichtlich, befinden sich die Substituenten in 9-Stellung nicht in Konjugation zum Doppelbindungssystem der Flavine.

Lage und Höhe der Absorptionsbanden des 9-Phenyl-flavins in 90 Vol.% Chloroform + 10 Vol.% Alkohol.

446 mμ	$K = 18{,}5 \times 10^3$	368 mμ	$9{,}5 \times 10^3$
437 mμ	$\mathbf{20{,}0} \times 10^3$	**339 mμ**	$\mathbf{16{,}5} \times 10^3$
426 mμ	$17{,}5 \times 10^3$	325 mμ	$12{,}5 \times 10^3$
400 mμ	$13{,}0 \times 10^3$	**270 mμ**	$\mathbf{66{,}5} \times 10^3$

3-Methyl-9-phenyl-flavin.

0,50 g o-Amino-diphenylamin wurden in eine Lösung von 0,80 g der Natriumbisulfitverbindung des Mono-methylalloxans (aus Theobromin) und 0,80 g Borsäure in 50 ccm Eisessig eingetragen und einige Zeit auf 50° erwärmt. Beim Abkühlen schied sich das Flavin in sehr schön glitzernden, orangegelben Kryställchen ab, die mit Wasser gewaschen, getrocknet und aus Eisessig umkrystallisiert wurden. Ausbeute: 0,460 g = 55% d. Th. (ohne Verarbeitung der farbstoffreichen Mutterlaugen).

4,322 mg Sbst.: 10,55 mg CO_2, 1,53 mg H_2O.

2,580 mg Sbst.: 0,424 ccm N (24°, 743 mm).

$C_{17}H_{12}N_4O_2$ (304,1) Ber. C 67,08%, H 3,97%, N 18,42%
Gef. C 66,57%, H 3,56%, N 18,47%

Das 3-Methyl-9-phenyl-flavin krystallisiert aus siedendem Eisessig in orangegelben, gerade abgeschnittenen, schmalen Prismen, die ohne eine Spur von Veränderung zu zeigen, auf 360° erhitzt werden können. In verd. Alkali ist die Substanz auch in der Siedehitze vollkommen unlöslich. Die Löslichkeit in Pyridin und in Amylalkohol ist ähnlich wie beim 9-Phenyl-flavin. Wie dieses ist die Substanz ganz geschmacklos.

d-Riboseoxim.

6 g d-Ribose wurden in kleinen Anteilen in eine Lösung von 2 g freiem Hydroxylamin in 70 ccm abs. Alkohol, die auf 75° erwärmt war, eingetragen. Beim Stehen über Nacht schieden sich 4,7 g Oxim aus. Das d-Riboseoxim ist leicht löslich in Wasser. Aus abs. Alkohol krystallisiert es in feinen, weißen Nädelchen, die

zu Büscheln oder Doppelbüscheln angeordnet sind und bei 141° (k. Th.) schmelzen.

Zur Analyse wurde bei 100° unter 0,1 mm 1 Stde. getrocknet.
4,243 mg Sbst.: 5,690 mg CO_2, 2,60 mg H_2O.
4,162 mg Sbst.: 0,307 ccm N (21°, 757 mm).

$C_5H_{11}N_1O_5$ (161,5) Ber. C 36,34%, H 6,71%, N 8,48%
Gef. C 36,57%, H 6,86%, N 8,53%

Die wässrige Lösung zeigt Mutarotation:

$[\alpha]_D^{20}$ = (+3,78×100) : (7,00×1) = + 54° nach 10 Min.
„ = (+2,83×100) : (7,00×1) = + 40° nach 70 Min.
„ = (+1,93×100) : (7,00×1) = + 28° nach 270 Min.
„ = (+0,66×100) : (7,00×1) = + 9,5° nach 17 Stdn.
„ = (+0,44×100) : (7,00×1) = + 6,3 Endwert.

Die Substanz besitzt keinen ausgesprochenen Geschmack.

1,2-Dimethyl-4-nitro-5-(d-1'-ribityl-amino)-benzol.

5 g d-Riboseoxim wurden in 100 ccm Wasser gelöst und mit insgesamt 300 g 3% Natriumamalgam reduziert, wobei durch Einwerfen von Eis die Temperatur zwischen 20 und 25° und die Reaktion durch Zutropfen von 1-n, später 2-n Schwefelsäure eben lackmussauer gehalten wurde. Die Aufarbeitung erfolgte nach der von M. Roux für andere Zuckeramine gegebenen Vorschrift. Eine Probe der alkohol. Lösung des d-Ribamins schied auf Zusatz von alkoholischer Oxalsäure kein krystallisierendes Oxalat aus (Unterschied zu Arabinamin). Ich verwendete daher für die weiteren Versuche den durch Einengen der alkoholischen Lösung im Vacuum erhaltenen Syrup, dessen Gehalt an Ribamin durch Titration mit 0,1 n Schwefelsäure (Methylrot) zu 1,2 g bestimmt wurde. 1,2 g öliges d-Ribamin und 0,8 g 1,2-Dimethyl-4,5-dinitrobenzol (Schmp. 115—116°) wurden mit 15 ccm 80% wässrigem Aethylalkohol 6 Stdn. auf 130° erhitzt. Nach dem Erkalten habe ich die mit Krystallen durchsetzte orangerote Lösung im Vacuum vom Alkohol befreit, 1 Stde. mit Wasserdampf destilliert und im Vacuum eingeengt. Im Eisschrank krystallisierten über Nacht 0,65 g 1,2-Dimethyl-4-nitro-5-(d-1'-ribityl-amino)-benzol aus. Die Substanz ist in Aether und Chloroform nahezu unlöslich. Aus Wasser, worin sie sich viel leichter als die entsprechende Arabitylverbindung löst, krystallisiert sie in orangeroten Prismen, die mitunter büschelig vereinigt sind und bei 127° (k. Th.) schmelzen.

4,502 mg Sbst.: (2 Stdn. bei 100° und 0,1 mm getrocknet) 8,57 mg CO_2, 2,61 mg H_2O.
3,035 mg Sbst.: 0,249 ccm N (27°, 760 mm).

$C_{13}H_{20}N_2O_6$ (302,2) Ber. C 51,97%, H 6,71%, N 9,33%
Gef. C 51,92%, H 6,49%, N 9,33%

Lactoflavin.

0,60 g 1,2-Dimethyl-4-nitro-5-(d-1'-ribityl-amino)-benzol wurden in 75 ccm 80-proz. wässrigem Aethylalkohol mit 0,20 g Platinoxyd und Wasserstoff geschüttelt. Nach 20 Min. war die berechnete Menge von 3,0 Molen Wasserstoff (Endwert) aufgenommen und die Lösung entfärbt. Nach dem Abfiltrieren vom Katalysator wurde im Vacuum zur Trockne verdampft, der farblose, noch ölige Rückstand sofort in 30 ccm Eisessig gelöst und zu einer in der Siedehitze bereiteten, auf 30° abgekühlten Lösung von 0,46 g Alloxan-tetrahydrat und 0,90 g Borsäure in 30 ccm Eisessig zufließen lassen. Die vor Zugabe des Diamins auskrystallisierte Alloxan-Borsäure-Verbindung (Schmp. 152°) ging zunächst in Lösung und nach einigen Minuten (Schütteln) setzte die Krystallisation des Farbstoffes ein. Zur Reinigung wurde nach 1 Stde. alles im Vacuum zur Trockne gebracht und der rein gelbe, durchwegs kryst. Rückstand im Soxhlet-Apparat mit abs. Alkohol extrahiert. Dabei schied sich das 6,7-Dimethyl-9-d-ribo-flavin in goldgelben, wollig verfilzten, feinen Nadeln ab, die ohne weitere Reinigung bereits 291—292° (k. Th. unter Zers.) schmolzen und in der elementaren Zusammensetzung ebenfalls mit natürlichem Lactoflavin bereits übereinstimmten. Die Ausbeute (0,68 g) entsprach 91% d. Th.

(2 Stdn. bei 100°, 0,1 mm, P_2O_5 getrocknet).
4,22 mg Sbst.: 8,41 mg CO_2, 2,10 mg H_2O.
2,676 mg Sbst.: 0,346 ccm N (25°, 759 mm)
$C_{17}H_{20}N_4O_6$ (376,2) Ber. C 54,23%, H 5,36%, N 14,88%
Gef. C 54,35%, H 5,57%, N 14,79%

Ueber den eingehenden Vergleich mit dem Naturprodukt wurde im theoretischen Teil der Arbeit berichtet.

3-Methyl-lactoflavin.

50 mg 1,2-Dimethyl-4-nitro-5-(d-1'-ribityl-amino)-benzol wurden in 15 ccm 80-proz. wässrigem Aethylalkohol mit 15 mg Platinoxyd und Wasserstoff geschüttelt. Nachdem die Lösung farblos geworden war, wurde vom Katalysator abfiltriert, im Vacuum zur Trockne verdampft und das Diamin in 5 ccm Eisessig aufgenommen. Diese Lösung ließ ich zu 100 mg Methyl-alloxan-natriumbisulfit-Verbindung und 200 mg Borsäure in 10 ccm Eisessig zutropfen und schüttelte noch 1 Stde. bei 20 bis 25°. Der in üblicher Weise isolierte Farbstoff krystallisiert aus

Wasser in orangefarbigen, millimeterlangen, derben Prismen, die an den Enden abgeschrägt sind und bei 272° (k. Th.) schmelzen. Ausbeute 25 mg (38% d. Th.)

2,859 mg Sbst.: 0,362 ccm N (28°, 754 mm)
$C_{18}H_{22}N_4O_6$ (390,2) Ber. N 14,34% Gef. N 14,29%

Das 3, 6, 7-Trimethyl-9-d-ribo-flavin läßt sich aus wässriger Lösung nicht durch Chloroform oder Aether ausschütteln. Durch verd. Natronlauge wird es schon bei 15—20° in irreversibler Weise schnell entfärbt (Hydrolyse). Dies Verhalten entspricht dem anderer 3-Methyl-flavine. Verd. Natriumcarbonatlösung löst nicht besser als Wasser und läßt den Farbstoff unverändert. Die im Tierversuch beobachtete Unwirksamkeit dürfte daher nicht auf eine Zerstörung des Farbstoffes durch die Alkalescenz des Darmes zurückzuführen sein.

1-Nitro-2-(d-1'-ribityl-amino)-benzol.

300 mg d-Ribamin und 180 mg o-Dinitrobenzol wurden in 20 ccm Pyridin und 5 ccm Wasser 4 Stunden unter Rückfluß gekocht. Beim beginnenden Sieden setzte sofort starke Rotfärbung ein. Nach dem Erkalten wurde im Vacuum zur Trockne gebracht und der Rückstand einer ½stündigen Wasserdampfdestillation unterworfen, danach wurde im Vacuum wieder auf ein kleines Volumen eingeengt und erkalten lassen. Es krystallisierten 140 mg 1-Nitro-2-(d-1'-ribityl-amino)-benzol aus. Schmp. 132° (k. Th.) Nach 2-maligem Umkrystallisieren aus Alkohol war der Schmp. auf 134—135° gestiegen. Aus Alkohol krystallisiert die Substanz in langen, orange gefärbten Stäbchen.

Zur Analyse wurde 2 Stdn. bei 100° unter 0,05 mm getrocknet.

4,025 mg Sbst.: 7,16 mg CO_2, 2,09 mg H_2O.
3,202 mg Sbst.: 0,285 ccm N (753 mm, 21°).
$C_{11}H_{16}N_2O_6$ (272,1) Ber. C 48,50%, H 5,92%, N 10,30%
Gef. C 48,52%, H 5,81%, N 10,24%

9-d-Ribo-flavin.

110 mg 1-Nitro-2-(d-1'-ribityl-amino)-benzol wurden in 20 ccm 80-proz. wässrigem Aethylalkohol mit Platin und Wasserstoff reduziert. Die vom Katalysator filtrierte Lösung wurde im Vacuum zur Trockne gebracht, in 10 ccm Eisessig aufgenommen und mit 90 mg Alloxan und 200 mg Borsäure in 5 ccm Eisessig zum Flavin bei Zimmertemperatur kondensiert. In reinem Zustand isoliert wurden 40 mg 9-d-Ribo-flavin. Schmp. 283—284°

Drehung. Natriumlinie (Natriumlampe)
$[\alpha]_D^{20} = (-0{,}11^0 \times 100) : (0{,}2553 \times 1) = -43^0 \pm 4^0$ in n/10 NaOH
$[\alpha]_D^{20} = (+0{,}17^0 \times 100) : (0{,}1276 \times 1) = +133^0 \pm 10^0$ in n/20 NaOH + ges/2 Borax

Das 9-d-Ribo-flavin krystallisiert aus verd. Essigsäure in langen Nadeln, die stark bitter schmecken und in ihren Eigenschaften (Absorptionspektrum, Fluorescenz usw.) ganz den 9-Arabo-flavinen gleichen.

Zur Analyse wurde 2 Stdn. bei 100° über P_2O_5 unter 0,1 mm getrocknet.

4,482 mg Sbst.: 8,45 mg CO_2, 2,030 mg H_2O.
4,170 mg Sbst.: 8,17 mg CO_2, 1,86 mg H_2O.
3,247 mg Sbst.: 0,444 ccm N (746 mm, 19°)

$C_{15}H_{16}N_4O_6$ (348,1) Ber. C 51,71%, H 4,62%, N 16,09%
Gef. C 51,97%, H 5,05%, N 15,70%
Gef. C 52,18%, H 4,87%,

1-Nitro-2-(d-1'-glucityl-amino)-benzol.

5,0 g d-Glucamin und 3,0 g o-Dinitrobenzol wurden in 20 ccm 80-proz. wässrigem Aethylalkohol 6 Stdn. auf 135° erhitzt. Nach dem Erkalten wurde die orangerote Flüssigkeit, in der ein Teil des Kondensationsproduktes auskrystallisiert war, im Vacuum zur Trockne gebracht und der Rückstand 2-mal aus Eisessig umkrystallisiert. Ausbeute 2,4 g an 1-Nitro-2-(d-1'-glucityl-amino)-benzol. Schmp. 157—158° (k. Th.)

Aus Eisessig krystallisiert die Substanz in haarförmigen, feinen Nadeln.

Zur Analyse wurde 2 Stdn. bei 100° über P_2O_5 unter 0,1 mm getrocknet.

4,094 mg Sbst.: 7,14 mg CO_2, 2,15 mg H_2O.
3,744 mg Sbst.: 0,300 ccm N (754 mm, 25°).

$C_{12}H_{18}N_2O_7$ (302,15) Ber. C 47,66%, H 6,00%, N 9,27%
Gef. C 47,55%, H 5,88%, N 9,11%

1,2-Dimethyl-4-nitro-5-(d-1'-glucityl-amino)-benzol.

5 g d-Glucamin und 3,3 g 1,2-Dimethyl-4,5-dinitrobenzol wurden in 20 ccm 80-proz. wässrigem Aethylalkohol 6 Stdn. auf 135° erhitzt. Nach dem Erkalten wurde im Vacuum vom Lösungsmittel befreit, aus Eisessig umkrystallisiert, abgesaugt, auf der Nutsche mit Chloroform, worin die Substanz unlöslich ist, gewaschen. Ausbeute 2,5 g. Schmp. (2-mal aus Eisessig umkrystallisiert): 175—176° (k. Th.). Aus Eisessig krystallisiert das 1,2-

Dimethyl-4-nitro-5-(d-1'-glucitiyl-amino)-benzol in büschelig angeordneten, an den Enden zugespitzten Prismen.

Zur Analyse wurde 2 Stdn. bei 100° unter 0,01 mm über Phosphorpentoxyd getrocknet.

4,458 mg Sbst.: 8,29 mg CO_2, 2,70 mg H_2O.
3,951 mg Sbst.: 0,296 ccm N (754 mm, 25°).

$C_{14}H_{22}N_2O_7$ (330,18) Ber. C 50,88%, H 6,71%, N 8,48%
Gef. C 50,72%, H 6,78%, N 8,51%

9-d-Gluco-flavin.

0,80 g 1-Nitro-2-(d-1'-glucityl-amino)-benzol wurden in 30 ccm 80-proz. Aethylalkohol mit Platin und Wasserstoff zum 1-Amino-2-(d-1'-glucityl-amino)-benzol reduziert. Die vom Katalysator befreite Diaminlösung wurde im Vacuum zur Trockne verdampft und nun mit Alloxan-Borsäure in Eisessig bei Zimmertemperatur kondensiert. (0,55 g Alloxan und 1,0 g Borsäure in 20 ccm Eisessig). Nach längerem Stehen wurde der Eisessig im Vacuum abgedampft und der Rückstand aus Wasser umkrystallisiert, getrocknet (870 mg Flavin), dann 1-mal mit 200 ccm abs. Alkohol ausgekocht und nochmals aus Wasser umkrystallisiert. Aus verd. Essigsäure krystallisiert das 9-d-Gluco-flavin in gelben Nädelchen, die oft kugelförmig vereinigt sind. Schmp. 289—290° (k. Th. unter Zers.)

4,241 mg Sbst.: 7,895 mg CO_2, 1,91 mg H_2O.
3,033 mg Sbst.: 0,397 ccm N (754 mm, 22°).

$C_{16}H_{18}N_4O_7$ (378,17) Ber. C 50,77%, H 4,79%, N 14,82%
Gef. C 50,77%, H 5,04%, N 15,03%

Pentaacetyl-9-d-gluco-flavin.

Das 9-d-Glucoflavin wurde mit Pyridin und Essigsäureanhydrid zum Sieden erhitzt. Die Aufarbeitung wurde nach der von R. Kuhn und Th. Wagner-Jauregg[39]) für die Acetylierung des Lactoflavins gegebenen Vorschrift ausgeführt. Das Penta-acetyl-9-d-gluco-flavin schmolz bei 202° und krystallisierte aus wässrigem Alkohol in gelben, langen Stäbchen.

4,431 mg Sbst.: 8,66 mg CO_2, 1,96 mg H_2O.
2,844 mg Sbst.: 0,241 ccm N (754 mm, 20°).

$C_{26}H_{28}N_4O_{12}$ (588,25) Ber. C 53,04%, H 4,79%, N 9,53%
Gef. C 53,30%, H 4,95%, N 9,79%

---

[39]) B. *66*, 1577 (1933).

3-Methyl-9-d-gluco-flavin.

0,50 g 1-Nitro-2-(d-1'-glucityl-amino)-benzol wurden zum entsprechenden Diamin katalytisch reduziert und nach Verdampfen des Lösungsmittels in Eisessig gelöst und mit 0,5 g Methyl-alloxan-Natriumbisulfit und 1,0 g Borsäure in Eisessig bei 40° geschüttelt. Nach 2 Stunden wurde im Vacuum vom Eisessig befreit und der Rückstand aus verd. Essigsäure umkrystallisiert, getrocknet (0,35 g), mit abs. Alkohol ausgekocht und wieder aus verd. Essigsäure umkrystallisiert. Aus Wasser krystallisiert das 3-Methyl-9-d-gluco-flavin in langen, feinen spitzen Nadeln von gelber Farbe, die wollig verfilzt sind. Schmp. 264—266°.

Zur Analyse wurde 5 Stdn. bei 130° über P_2O_5 unter 0,1 mm getrocknet.

4,220 mg Sbst.: 8,04 mg CO_2, 2,04 mg H_2O.
2,620 mg Sbst.: 0,325 ccm N (758 mm, 26°).
$C_{17}H_{20}N_4O_7$ (392,19) Ber. C 52,01%, H 5,14%, N 14,28%
Gef. C 52,08%, H 5,41%, N 14,12%

6,7-Dimethyl-9-d-gluco-flavin.

200 mg 1,2-Dimethyl-4-nitro-5-(d-1'-glucityl-amino)-benzol wurden in 20 ccm 90-proz. wässrigem Aethylalkohol mit 100 mg Platinoxyd und Wasserstoff bis zur Entfärbung geschüttelt (15 Min.) Danach wurde vom Katalysator filtriert, im Vacuum ohne Kapillare eingeengt. Dabei krystallisierte das Diamin als weiße Krystallmasse aus. Es wurde in 15 ccm Eisessig gelöst und zu einer zum Sieden erhitzten und wieder abgekühlten Lösung von 130 mg Alloxan mit 250 mg Borsäure in 10 ccm Eisessig unter Schütteln gegeben. Die Kondensation setzte sofort ein, erkenntlich an dem Auftreten der charakteristischen gelbgrünen Fluorescenz und die Alloxan-Borsäureverbindung, die vorher auskrystallisiert war, ging in Lösung. Ueber Nacht schieden sich 150 mg gelbe, kryst. Substanz aus, die zunächst 1-mal aus Wasser umkrystallisiert, abgesaugt und getrocknet wurde. Dann wurde 1 Stde. mit 100 ccm abs. Alkohol gekocht, dieser im Vacuum zum größten Teil abdestilliert, die Substanz abzentrifugiert. Man erhält so das 6,7-Dimethyl-9-d-gluco-flavin in langen Nadeln, die zu Büscheln und Doppelbüscheln vereinigt sind. Schmp. 273—274° (k. Th.)

Zur Analyse wurde bei 100° 4 Stdn. getrocknet über P_2O_5. Die Substanz ist hygroskopisch.

3,980 mg Sbst.: 7,715 mg CO_2, 2,0 mg H_2O.
3,224 mg Sbst.: 0,386 ccm N (751 mm, 22°).

$C_{18}H_{22}N_4O_7$ (406,20) Ber. C 53,17%, H 5,46%, N 13,79%
Gef. C 52,87%, H 5,62%, N 13,69%

Pentaacetyl-6,7-dimethyl-9-d-gluco-flavin.

Das 6,7-Dimethyl-9-d-gluco-flavin wurde in Pyridin und Essigsäureanhydrid in der üblichen Weise acetyliert. Das Pentaacetyl-6,7-dimethyl-9-d-gluco-flavin krystallisierte aus Alkohol in langen Stäbchen und schmolz bei 240° (k. Th.)

Zur Analyse wurde 2 Stdn. bei 100° und 0,01 mm getrocknet über P_2O_5.

4,173 mg Sbst.: 8,37 mg CO_2, 2,065 mg H_2O.
4,106 mg Sbst.: 0,329 ccm N (747 mm, 22°).
$C_{28}H_{32}N_4O_{12}$ (616,25) Ber. C 54,52%, H 5,23%, N 9,08%
Gef. C 54,70%, H 5,54%, N 9,11%

3,6,7-Trimethyl-9-d-gluco-flavin.

1,0 g 1,2-Dimethyl-4-nitro-5-(d-1'-glucityl-amino)-benzol wurden mit Platin und Wasserstoff bis zur Entfärbung und Konstanz des Wasserstoffverbrauchs hydriert (3 Mole H_2). Die im Vacuum eingedampfte Lösung (weißer, krystallisierter Rückstand) wurde in 10 ccm Eisessig aufgenommen und zu einer Mischung von 0,8 g Methyl-alloxan-Natriumbiulfit und 1,5 g Borsäure in 20 ccm Eisessig einfließen lassen und längere Zeit bei 40° gehalten. Dann wurde im Vacuum eingeengt und der Rückstand aus verd. Essigsäure umkrystallisiert, wobei das 3, 6, 7-Trimethyl-9-d-gluco-flavin in wollig verfilzten, ganz langen, spitzen, orange gefärbten Nädelchen erhalten wurde. Schmp. 279—280°. Die Substanz ist hygroskopisch.

Zur Analyse wurde 10 Stdn. bei 130° unter 0,01 mm über P_2O_5 getrocknet.

3,387 mg Sbst.: 0,391 ccm N (755 mm, 22°)
$C_{19}H_{24}N_4O_7$ (420,22) Ber. N 13,33%, Gef. N 13,27%

Katalytische Hydrierung von d-Riboseoxim.

0,5 g Platinoxyd wurden in 100 ccm Wasser suspendiert und mit Wasserstoff bei 37° reduziert. Dann ließ ich eine Lösung von 1,00 g d-Riboseoxim in 40 ccm Wasser innerhalb 4 Stunden zutropfen. Als alles zugetropft war, war auch die berechnete Menge Wasserstoff verbraucht. Die Reduktionslösung befand sich während der Hydrierung bei einer Temperatur von 37°, da es günstig gefunden wurde bei etwas erhöhter Temperatur zu reduzieren. Die gewünschte Temperatur von 37° wurde bequem durch eine Heißluftdusche erreicht, die in etwa 10 cm Abstand von dem

Hydriergefäß befestigt war. Die Oximlösung befand sich außerhalb der heißen Zone und hatte Zimmertemperatur (20°). Nach beendeter Reduktion wurde vom Katalysator filtriert, auf 250 ccm aufgefüllt und 20 ccm davon nach Kochen von 10 Min. mit n/10 Schwefelsäure (Indikator: Methylrot) titriert. Ausbeute 84% d-Ribamin.

Aus 1,5 g so dargestelltem d-Ribamin erhielt ich nach Kondensation mit 0,95 g 1,2-Dimethyl-4,5-dinitro-benzol 1,12 g Dimethyl-4-nitro-5-(d-1'-ribityl-amino)-benzol vom richtigen Schmp. 127°, das sind etwa 74% d. Th.

Katalytische Hydrierung von l-Arabinoseoxim.

Zu 0,5 g reduziertem Platinoxyd in 100 ccm Wasser wurden im Verlaufe von 5 Stunden 1,00 g l-Arabinoseoxim, gelöst in 40 ccm Wasser, zutropfen lassen. Temperatur der Reduktionslösung: 37°. Ausbeute 85%. (Die mit n/10 Schwefelsäure titrierte Probe war 10 Min. gekocht worden, wobei eine geringe Menge Ammoniak entwich). Als Derivat habe ich das l-Arabinaminoxalat dargestellt, das den Schmp. 190—191° zeigte und mit l-Arabinamin-oxalat, das nach M. Roux dargestellt war, keine Schmelzpunktsdepression zeigte.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Anfang März 1934 bis Ende November 1935 im chemischen Institut des Kaiser Wilhelm Institutes für med. Forschung in Heidelberg mit den mir dort zur Verfügung stehenden Mitteln ausgeführt.

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Richard Kuhn, bin ich zu tiefem Danke verpflichtet für den mir an seinem Institut gewährten Arbeitsplatz, sowie für die vielen wertvollen Ratschläge, mit denen er die Arbeit förderte.

Lebenslauf.

Am 1. Oktober 1911 wurde ich in Eichelsdorf (Kreis Schotten, Oberhessen) als Sohn des Reichsbahnsekretärs Peter Weygand und seiner Ehefrau Emilie, geb. Beilecke, geboren. Nach dreijährigem Besuch der Volksschule in Eichelsdorf trat ich in die Sexta der Realschule zu Schotten ein. Nach sechsjährigem Besuch dieser Anstalt trat ich in das Realgymnasium zu Gießen ein, das ich Ostern 1930 mit dem Reifezeugnis verließ.

Vom Sommersemester 1930 bis zum Wintersemester 1933/34 widmete ich mich dem Studium der Chemie an der Johann Wolfgang Goethe-Universität zu Frankfurt a. Main. Die I. chemische Verbandsprüfung bestand ich am 26. 10. 1932, die II. am 20. 2. 1934. Seit dem 1. 3. 1934 bin ich im Kaiser Wilhelm Institut für med. Forschung in Heidelberg tätig.

Friedrich Weygand.